



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΕ ΣΥΜΠΡΑΞΗ ΜΕ ΤΑ ΤΕΙ ΗΠΕΙΡΟΥ**

**“Κρυοδιατήρηση Σπέρματος και Τεχνικές Εκτίμησης Ποιότητας
Σπέρματος Ιχθύων”**

Τέφας Ηλίας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Ναθαναηλίδης Κοσμάς. Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιχθυοκομίας & Αλιείας, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Ηπείρου
2. Πανταζής Παναγιώτης. Λέκτορας, Εργαστήριο Ιχθυολογίας & Ιχθυοπαθολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. Περδικάρης Κωνσταντίνος. Τμήμα Αλιείας, Νομός Θεσπρωτίας

Καρδίτσα 2008



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 7548/1
Ημερ. Εισ.: 10-09-2009
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
639.3
ΤΕΦ



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

MASTER OF SCIENCE THESIS IN THE DEPARTMENT OF VETERINARY
MEDICINE IN COLLABORATION WITH TECHNOLOGICAL EDUCATIONAL
INSTITUTE OF EPIRUS

**“Sperm Cryopreservation and Methodology for Evaluating
Sperm Quality”**

Tefas Ilias

ADVISOR COMMITTEE

1. Nathanailides Cosmas. Associate Professor, Department of Aquaculture & Fisheries, Technological Educational Institute of Epirus
2. Pantazis Panos. Lecturer, Department of Aquaculture & Fish Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly
3. Perdikaris Costas. Fisheries Department. Prefecture of Thesprotia

Karditsa. Greece 2008

Στην οικογένεια μου και τη σύντροφο μου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η σημαντική ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών, που έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια και η γνώση ότι η ποιότητα και των δυο γαμετών είναι κρίσιμη για την επιτυχία της γονιμοποίησης και την επιβίωση των προνυμφών, έδωσε ώθηση στην μελέτη του σπέρματος, στους παράγοντες που την επηρεάζουν, αλλά και στην εξέλιξη των τεχνικών διατήρησης του.

Η αποθήκευση των γεννητικών προϊόντων, για μικρό ή μεγάλο χρονικό διάστημα, προέκυψε ως ανάγκη εξασφάλισης σπέρματος, κατά τη διάρκεια της τεχνητής αναπαραγωγής ή δημιουργίας ιδανικών υβριδίων μεταξύ των διάφορων ειδών και ανάμεσα σε αυτές τις τεχνικές, η αποθήκευση του σπέρματος και η κρυοδιατήρηση, είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος. Η βραχυπρόθεσμη διατήρηση του σπέρματος σε ψυκτικό θάλαμο, η οποία μπορεί να ποικίλει από ώρες σε εβδομάδες, είναι μια τεχνική, αποδοτικά χρησιμοποιούμενη στα εκκολαπτήρια, ενώ, επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της ποιότητας του σπέρματος και τον έλεγχο για ασθένειες πριν την κρυοδιατήρηση. Η επιστήμη της κρυοδιατήρησης, σχετίζεται με την μακράς διάρκειας αποθήκευση βιολογικού υλικού σε μια κατεψυγμένη, αλλά βιώσιμη κατάσταση, σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (-196°C).

Η κρυοδιατήρηση του σπέρματος και η δημιουργία τράπεζας γονιδίων, μπορεί να αποδειχθεί πολύ ωφέλιμη στις υδατοκαλλιέργειες, αλλά και για να διατηρηθεί η γενετική ποικιλότητα πληθυσμών ψαριών τα οποία κινδυνεύουν με εξαφάνιση. Η χρησιμοποίηση κρυοπροστατευτικών ουσιών, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την προστασία βιολογικών ιστών από ζημιές κατά την κατάψυξη, είναι απαραίτητη στην κρυοδιατήρηση του σπέρματος, καθώς τα ιδανικά κρυοπροστατευτικά εισβάλλουν στο κύτταρο, ώστε να ρυθμίσουν τον σχηματισμό κρυστάλλων και, επίσης, είναι στο εξωτερικό του κυττάρου, για να ελέγχουν την συγκέντρωση αλάτων. Η κρυοζημιά που παρατηρείται στο σπέρμα μετά την κρυοδιατήρηση, είναι αποτέλεσμα της συσσωρευμένης ζημιάς των κυττάρων, οι οποίες προκαλούνται κατά τη διάρκεια της κρυοδιατήρησης και μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της κινητικότητας και της βιωσιμότητας ή στη ζημιά της ακεραιότητας του DNA.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας, ήταν να εφαρμοστούν διαφορετικά πρωτόκολλα για την εκτίμηση της βιωσιμότητας και της ακεραιότητας του

σπέρματος και να μελετηθούν τα προστατευτικά αποτελέσματα διάφορων κρυοπροστατευτικών διαλυμάτων, για τη διαδικασία κρυοδιατήρησης, αλλά και βραχυπρόθεσμης διατήρησης του σπέρματος. Ανάμεσα στις παραμέτρους που εξετάστηκαν ήταν και η τοξικότητα, ενός ευρέως χρησιμοποιούμενου κρυοπροστατευτικού (του διμεθυλοσουλφοξειδίου, DMSO).

Για τα είδη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν δεν υπάρχει προηγούμενη πληθώρα αναφορών, όσον αφορά την εφαρμογή αυτών των τεχνικών, ενώ η κρυοδιατήρηση του σπέρματος λούτσων είναι μια τεχνική για την οποία δεν εντοπίστηκαν βιβλιογραφικές αναφορές. Επίσης, η χρήση σπέρματος από ήδη νεκρά άτομα, συνιστά πρόκληση, καθώς το σπέρμα αυτών των ατόμων δεν είναι ποιοτικά ισότιμο με αυτό των ζωντανών ατόμων.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη ψαριών, λούτσοι (*Sphyraena sphyraena* Linnaeus, 1758) και κεφάλοι (*Mugil cephalus* Linnaeus, 1758) τα οποία αλιεύτηκαν στην περιοχή του Αμβρακικού κόλπου και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών και Εσωτερικών Υδάτων του ΤΕΙ Ηπείρου στην Ηγουμενίτσα, για την πραγματοποίηση του πειράματος. Αρχικά, εξετάστηκε η ποιότητα του σπέρματος αυτών των ψαριών, με τον υπολογισμό του ποσοστού των κινητικών σπερματοζωαρίων, της διάρκειας της κίνησης τους και του γοναδικού δείκτη.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν κατά την κρυοδιατήρηση του σπέρματος των λούτσων, έδειξαν την καταλληλότητα του διαλύματος 10% λέκιθου αυγού και 10% DMSO, ενώ στην κρυοδιατήρηση του σπέρματος των κεφάλων, παρατηρήθηκε επίσης η υπεροχή αυτού του διαλύματος. Κατά τη διατήρηση του σπέρματος των κεφάλων σε ψυκτικό θάλαμο, το καλύτερο αποτέλεσμα εμφανίστηκε με τη χρήση διαλύματος ακινητοποίησης, ενώ η χρήση του DMSO εμφάνισε τοξικά αποτελέσματα.

Τα αποτελέσματα αυτά, επιβεβαιώθηκαν με διάφορες τεχνικές εκτίμησης βιωσιμότητας και ακεραιότητας του σπέρματος (Commet Assay, Sperm Chromatin Dispersion Test, χρώση με Trypan Blue), οι οποίες έχουν μέλλον στις υδατοκαλλιέργειες. Όσον αφορά την πραγματοποίηση της Commet Assay, η οποία σχετικά πρόσφατα εφαρμόστηκε στο σπέρμα ψαριών, μετά από πολλά πειράματα έγινε προσαρμογή της μεθοδολογίας και καθορίστηκε πρωτόκολλο ώστε να προσαρμοστεί στην ανίχνευση της ζημιάς στο σπέρμα των ιχθύων.

ABSTRACT

The expansion of the aquaculture industry and the realization that the gamete quality of both sperm and eggs is crucial for the success of fish hatchery operations, leads to the extensive study of fish sperm biology and on the factors affecting it and also the development of techniques for sperm cryopreservation.

Storage of sperm, in the short or long-term, arose as a need to ensure semen during artificial breeding for several reasons, including the need of stored sperm for creating hybrids between different species.

The short-term preservation of sperm in a cool chamber, which may range from hours to weeks, is a technique used efficiently in hatcheries, while also can be used to estimate the quality of sperm.

The science of cryopreservation refers to the long-term storage of biological material in a frozen, but sustainable situation, at very low temperatures. The storage of sperm for a long time, in liquid nitrogen, at a temperature - 196 ° C, is achieved using various cryoprotectants.

A sperm bank can be very useful for fish farms, but also, in order to maintain the genetic diversity of fish populations, which are at risk of extinction. The overall objective during freezing and thawing is to prevent or minimize the formation of harmful, intracellular ice crystals.

Cryodamage observed in sperm after freezing, is the result of accumulated damage of the cell, which caused during the process of freezing - thawing. The damage in sperm from this process is located in the morphological and functional integrity of spermatozoa and can result in a reduction of sperm mobility and survival or on impaired DNA integrity.

The purpose of this work was to apply different protocols for the evaluation of sperm viability and integrity and to study the protective effect of various cryoprotectants for sperm freezing and for short-term sperm storage.

After several trials, the protocol of Commet Assay was modified for use in fish sperm and the protocol is presented.

Two fish species were used for the experiments: *Sphyraena sphyraena* (Linnaeus, 1758) and *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758). Among parameters tested was the toxicity of a widely used cryoprotectant (DMSO).

For the cryopreservation of sperm of these two species, there is limited published work, and especially for *S.sphyraena*, *no published work could be found*. Moreover, the use of sperm from already dead fish is challenging, because sperm quality deteriorates rapidly after death.

In this experiment mature male fish, *S. sphyraena* and *M. cephalus* were used, which were caught in the Gulf of Amvrakikos and transported to the laboratory of TEI Epirus at Igoumenitsa. Initially, the quality of fishes' sperm was examined, then calculating the percentage of the kinetic sperm, the duration of motility and the gonadosomatic index.

The results with cryopreserved sperm of *S. sphyraena*, indicate that a solution composed of 10% Egg Yolk and 10% DMSO outperforms the other concentrations of these cryoprotectants. In the same manner, sperm of *M. cephalus*, exhibited similar results, compared to 10% methanol and 10% ethylene glycol.

In the short term cold storage experiments, for sperm of *M. cephalus*, the best outcome occurred using an immobilisation solution with no cryoprotectants, whereas the use of DMSO revealed toxic effects.

The results were confirmed by the various technical assessment of the viability and integrity of sperm (Trypan Blue staining, technical Sperm Chromatin Dispersion Test and Comet Assay), which have a great future in aquaculture.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ πολύ τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Αναπληρωτή καθηγητή Κ. Ναθαναηλίδη για την υποστήριξη και εμπύχωση του, καθώς και για τον χρόνο και το υλικό που έθεσε στη διάθεσή μου.

Ευχαριστώ θερμά τους υπεύθυνους του μεταπτυχιακού προγράμματος, την κ. Αθανασοπούλου Φ., αναπληρώτρια καθηγήτρια του πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τον κ. Πάσχο Ι., καθηγητή του ΤΕΙ Ηπείρου, για την ευκαιρία που μου έδωσαν να συμμετάσχω στο πρόγραμμα και ελπίζω να φάνηκα αντάξιος των προσδοκιών τους.

Επίσης, ευχαριστώ τα μέλη του Εργαστηρίου Υδατοκαλλιεργειών και Εσωτερικών Υδάτων για την τεχνική υποστήριξη της παρούσας εργασίας και συγκεκριμένα την κυρία Ε. Γκούβα και την κυρία Α. Εργολάβου.

Ακόμη, ευχαριστώ θερμά την Δρ Α. Μπαρμπούτη του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την υποστήριξη της στην τεχνική Comet Assay και της οποίας η βοήθεια ήταν συνεχώς διαθέσιμη, καθώς και τον καθηγητή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Δημήτρη Γαλάρη, στο εργαστήριο του οποίου έχει αναπτυχθεί αυτή η τεχνική.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της οικογένειάς μου και την σύντροφο μου, οι οποίοι όλο αυτό το χρονικό διάστημα μου συμπαραστάθηκαν και ο καθένας τους με βοήθησε με τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT.....	3
Ευχαριστίες	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	6

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

1. Εισαγωγή	11
1.1 Σπέρμα καλής ποιότητας ως πολύτιμο γενετικό υλικό	12
2. Ορισμός και χαρακτηριστικά ποιότητας σπέρματος στα ψάρια	15
2.1. Ορισμός Ποιότητας Σπέρματος	15
2.2 Γενικά χαρακτηριστικά του σπέρματος ψαριών	17
3. Εκτίμηση της ποιότητας σπέρματος στα ψάρια	19
3.1 Εισαγωγή	19
3.2 Ικανότητα γονιμοποίησης	19
3.3 Σπερματοκρίτης και πυκνότητα σπέρματος	21
3.4 Συστατικά του σπερματικού πλάσματος	24
3.5 Βιωσιμότητα σπέρματος και ακεραιότητα της μεμβράνης	25
3.6 Μορφολογία σπέρματος	26
3.7 Κινητικότητα σπέρματος.....	28
3.7.1 Η σύνθεση του σπερματικού υγρού και η σχέση του με την κινητικότητα	33
4. Τεχνικές εκτίμησης κινητικότητας σπέρματος στα ψάρια	35
4.1 Εισαγωγή	35
4.2 Υποκειμενικές μέθοδοι	36
4.3 Ημι-ποσοτικές μέθοδοι	37
4.4 Ποσοτικές με τη βοήθεια υπολογιστών μέθοδοι	38

5. Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα του σπέρματος	39
5.1 Εισαγωγή	39
5.2 Επίπτωση στους γεννήτορες	41
5.2.1 Φωτοπερίοδος και θερμοκρασία εκτροφής	41
5.2.2 Διατροφή αρσενικών και μολυσματικοί παράγοντες.....	42
5.2.3 Επίδραση του στρες στους γεννήτορες	43
5.2.4 Ηλικία των γεννητόρων και αναπαραγωγική περίοδος.....	45
5.2.5 Ασθένειες, θερμοκρασία εκτροφής των αρσενικών γεννητόρων και ορμονική πρόκληση παραγωγής σπέρματος	47
5.3 Άμεσα αποτελέσματα στη γονιμοποίηση	48
5.3.1 Χρήση αναισθητικών και θερμοκρασία κατά την γονιμοποίηση	48
5.3.2 Μόλυνση με ούρα του σπέρματος	49
5.3.3 Ενεργοποίηση της κινητικότητας σπέρματος	50

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

1. Αποθήκευση γεννητικών προϊόντων	52
2. Διατήρηση του σπέρματος σε ψυκτικό θάλαμο (κρυοσυντήρηση)	53
3. Κρυοδιατήρηση	55
3.1 Εισαγωγή	55
3.2 Πλεονεκτήματα χρήσης κρυοδιατηρημένου σπέρματος	58
3.3 Ρυθμός απόψυξης – κατάψυξης και τεχνικές γονιμοποίησης	61
3.3.1 Ρυθμός κατάψυξης	61
3.3.2 Ρυθμός απόψυξης	64
3.3.3 Τεχνικές γονιμοποίησης κατεψυγμένου – αποψυγμένου σπέρματος	65
4. Κρυοπροστασία	66
4.1 Εισαγωγή	66

4.2 Κρυοπροστατευτικά	67
4.3 Extenders	72

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΖΗΜΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΚΡΥΟΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ

1. Εισαγωγή	75
2. Κρυοζημιά που ακολουθεί την κρυοδιατήρηση	76
2.1 Μορφολογική ζημιά	78
2.2 Φθορά στη φυσιολογία	82
2.3 Βιοχημικές και μεταβολικές αλλαγές	85
2.4 Ζημιά στο DNA	87
3. Τεχνικές εκτίμησης ζημιάς στο DNA	91
3.1 Εισαγωγή	91
3.2 Τεστ ανάλυσης της διασποράς χρωματίνης των σπερματοζωαρίων	91
3.3 Commet assay	93
3.3.1 Ηλεκτροφόρηση DNA μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης	93
3.3.2 Οπτική ανάλυση	94
4. Ποιότητα κρυοδιατηρημένου σπέρματος.....	95

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Συλλογή ψαριών και σπέρματος	97
2. Υπολογισμός γοναδοσωματικού δείκτη	100
3. Εκτίμηση κινητικότητας	101
4. Υπολογισμός αριθμού σπερματοζωαρίων.....	102
5. Διατήρηση σπέρματος σε ψυκτικό θάλαμο	103
6. Κρυοδιατήρηση	105

6.1 Σχηματισμός κρυοπροστατευτικών διαλυμάτων	105
6.1.1 Κρυοπροστατευτικά διαλύματα για το σπέρμα του <i>Sphyraena sphyraena</i>	105
6.1.2 Κρυοπροστατευτικά διαλύματα για το σπέρμα του <i>Mugil cephalus</i>	107
6.2 Προετοιμασία σπέρματος για ψύξη και κατάψυξη	107
6.3 Διαδικασία κατάψυξης σπέρματος	109
6.4 Απόψυξη σπέρματος	110
7. Τεχνικές εκτίμησης αποψυγμένου σπέρματος	111
7.1 Commet Assay	111
7.2 Τεστ Ανάλυσης της Διασποράς Χρωματίνης των Σπερματοζωαρίων (Sperm Chromatin Dispersion Test)	114
7.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων	114
7.2.2 Χρώση του δείγματος	115
7.3 Trypan Blue	117

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Γοναδοσωματικός δείκτης και αριθμός σπερματοζωαρίων	118
2. Εκτίμηση κινητικότητας	119
3. Βραχυπρόθεσμη Κρυοσυντήρηση (4 °C) σπέρματος	123
4. Κρυοδιατήρηση σπέρματος	128
4.1 Κρυοδιατήρηση σπέρματος του <i>Sphyraena sphyraena</i>	128
4.2 Κρυοδιατήρηση σπέρματος του <i>Mugil cephalus</i>	130
5. Commet assay	131
6. Τεστ Ανάλυσης της Διασποράς Χρωματίνης των Σπερματοζωαρίων (Sperm Chromatin Dispersion Test)	132
7. Trypan Blue	135

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συζήτηση και συμπεράσματα	139
--	------------

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

153

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η βιομηχανία εκτροφής ψαριών, έχει επικεντρωθεί περισσότερο στην ποιότητα των ωαρίων ή των προνυμφών, από ότι σε αυτή του σπέρματος, παρόλο που η ποιότητα και των δυο γαμετών είναι κρίσιμη, για την επιτυχία της γονιμοποίησης και την επιβίωση των προνυμφών. Σε μερικά είδη, η χαμηλή ποιότητα σπέρματος μπορεί να είναι ένας περιοριστικός παράγοντας στην εκτροφή τους, αλλά και σε ορισμένες περιπτώσεις, όπου το ποσοστό γονιμοποίησης είναι υψηλό, οι διαφορές στην ποιότητα του σπέρματος μεταξύ των αρσενικών ατόμων, όταν αναμεμιγμένο σπέρμα από πολλαπλά αρσενικά χρησιμοποιείται, μπορεί να μειώσει σημαντικά το μέγεθος του πληθυσμού και να επηρεάσει την μελλοντική γενετική ακεραιότητα των αποθεμάτων (Rurangwa *et al.*, 2004).

Οι μελέτες στην βιολογία του σπέρματος, άρχισαν τον 19^ο αιώνα. Διάφορα χαρακτηριστικά της βιολογίας του σπέρματος του ψαριού αναγνωρίστηκαν γρήγορα, όπως η ακινητοποίηση των σπερματοζωαρίων στο σπέρμα, η μικρή διάρκεια της κίνησης και η ανάγκη αραίωσης σε νερό, για να αρχίσει η κίνηση των σπερματοζωαρίων (Billard & Cosson, 1992).

Ένας από τους πρώτους επιστήμονες, που μελέτησαν την βιολογία του σπέρματος των ιχθύων ήταν ο Spallanzani, ο οποίος παρατήρησε το σπέρμα των ψαριών και απέδειξε ότι η διάρκεια της κινητικότητας είναι πολύ πιο σύντομη στον κυπρίνο (15 λεπτά), από ότι στον άντρα (8 ώρες). Επιπλέον μελέτες στην βιολογία του σπέρματος, ήταν σχετικές με την ανάπτυξη τεχνικών για την τεχνητή αναπαραγωγή του κυπρίνου. Ο Henneguy (1877), επίσης, παρατήρησε ότι το σπέρμα είναι μη κινητικό στους αναπαραγωγικούς αδένες των αρσενικών και ότι η διάρκεια της κινητικότητας είναι πολύ σύντομη (Billard *et al.*, 1995).

Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, οι περισσότερες μελέτες αφιερώθηκαν στο σπέρμα των σολομοειδών, εμπλέκοντας και τον ρόλο των ιόντων και της οσμωτικής πίεσης στην κινητικότητα (Billard *et al.*, 1995). Η ανάπτυξη της

τεχνητής γονιμοποίησης και της εκτροφής των σολομοειδών, η οποία ξεκίνησε στα μέσα του 19^{ου} αιώνα, πιθανώς σχετίζεται με αυτές τις μελέτες και τις πολλές άλλες παρόμοιες εργασίες που έγιναν εκείνη τη χρονική περίοδο (Billard & Cosson, 1992).

Καθώς η εκτροφή των ψαριών, ειδικότερα των σολομοειδών, εξελίσσονταν στην Βόρεια Αμερική και στην Ιαπωνία, επιπλέον μελέτες διενεργήθηκαν σε αυτές τις χώρες και επεκτάθηκαν και σε άλλα είδη (Billard *et al.*, 1995). Ο De Quatrefage (1853), ανέφερε ότι το ενδιαφέρον του με τα σπερματοζωάρια των ψαριών, ήταν μια απάντηση στην απαίτηση των ανθρώπων που είχαν σχέση με την εκτροφή ψαριών (Billard & Cosson, 1992).

Κατά τις δεκαετίες του 1940 και 1950, οι διάφορες μελέτες για το σπέρμα των ψαριών, επικεντρώθηκαν στην ικανότητα γονιμοποίησης και στην κινητικότητα του σπέρματος σε διάφορα διαλύματα. Από το 1950, οι έρευνες στο σπέρμα των ψαριών επεκτάθηκαν σημαντικά, σε πολλά είδη ψαριών και με προσανατολισμό στη βιολογία του σπέρματος, την μορφολογία, την κινητικότητα, την δραστηριότητα της κίνησης και την βιοχημεία του σπερματικού υγρού (Billard *et al.*, 1995) .

1.1 Σπέρμα καλής ποιότητας ως πολύτιμο γενετικό υλικό

Η αναπαραγωγή στους οργανισμούς, εξαρτάται από την παραγωγή υψηλής ποιότητας σπέρματος (Van Look & Kime, 2003). Για παράδειγμα, στις υδατοκαλλιέργειες, η χρησιμοποίηση υψηλής ποιότητας γαμετών από γεννήτορες σε αιχμαλωσία, είναι πολύ σημαντική για την διασφάλιση της παραγωγής μεγάλης αξίας απογόνων (Rurangwa *et al.*, 2004), ενώ η διαθεσιμότητα καλής ποιότητας γαμετών όλη τη διάρκεια του χρόνου, είναι σημαντική για να διασφαλιστεί ο συνεχής εφοδιασμός ψαριών (Oteme *et al.*, 1996). Επίσης, η ποιότητα του σπέρματος των αρσενικών γεννητόρων, επηρεάζει την παραγωγή υγιών προνυμφών (Rurangwa *et al.*, 2004).

Η τεχνική της τεχνητής αναπαραγωγής για την παραγωγή προνυμφών, απαιτεί μια μεγάλη ποσότητα καλής ποιότητας σπέρματος (Ho Kang *et al.*, 2004), οπότε η εμπορικής κλίμακας παραγωγή ψαριών, απαιτεί μια αξιόπιστη

πηγή, με δυνατότητες παροχής μεγάλου όγκου σπέρματος (Lang *et al.*, 2003). Εντούτοις, στα εκκολαπτήρια το σπέρμα είναι συχνά ανεπαρκές, και όσον αφορά την ποιότητα και όσον αφορά την ποσότητα, και δεν οδηγεί πάντα σε επιτυχή γονιμοποίηση, με την διαδικασία της τεχνητής γονιμοποίησης, που χρησιμοποιείται συχνά στα εκκολαπτήρια. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα σε είδη από τα οποία δεν λαμβάνεται, σταθερά, σπέρμα με κοιλιακή πίεση, όπως το Αφρικανικό γατόψαρο (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822), σε είδη που απαιτούν χρήση ορμονών για την παραγωγή σπέρματος ή για ψάρια των οποίων το σπέρμα περιέχει επιμόλυνση ούρων, κατά τη διάρκεια της λήψης του με άσκηση κοιλιακής πίεσης (Rurangwa *et al.*, 2004).

Η ποσότητα του σπέρματος που παράγεται από ένα εκκολαπτήριο ψαριών κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου, ποικίλει ανάλογα με το είδος, τα άτομα και την μέθοδο συλλογής (Melo & Godinho, 2006). Ορισμένα είδη ελευθερώνουν περιορισμένη ποσότητα σπέρματος και για παράδειγμα το καλκάνι (*Psetta maxima*), παράγει λιγότερο από 1 ml σπέρματος ανά ψάρι. Επιπλέον, η παραγωγή σπέρματος μπορεί να είναι ανεπαρκής για να υποστηρίξει την τεχνητή αναπαραγωγή, εξαιτίας των πολλών "παρτίδων" ωαρίων που παράγονται κατά τη διάρκεια της παρατεταμένης τεχνητής αναπαραγωγικής περιόδου, το οποίο σημαίνει ότι τα αρσενικά, επανειλημμένως υφίστανται χειρισμούς και αφαιρείται, σχεδόν, όλο το σπέρμα τους (Rurangwa *et al.*, 2004). Στην περίπτωση του γατόψαρου *Heterobranchius longifilis* (Valenciennes, 1840), πολλά αρσενικά πρέπει να θανατωθούν για τη λήψη σπέρματος σε κάθε αναπαραγωγική περίοδο, γιατί δεν μπορεί να συλλεχθεί με κοιλιακή πίεση και προς το παρόν, δεν υπάρχει κάποιο αντικειμενικό κριτήριο που να επιτρέπει την αναγνώριση της παραγωγής σπέρματος από ένα αρσενικό άτομο (Oteme *et al.*, 1996).

Επιπλέον, η συλλογή και η αποθήκευση καλής ποιότητας σπέρματος για μελλοντική χρήση, μπορεί να προσφέρει μεγάλη ευκολία στην τεχνητή αναπαραγωγή και να μειώσει το στρες από την επαναλαμβανόμενη συλλογή σπέρματος στους αρσενικούς γεννήτορες, το οποίο με τη σειρά του, έχει αρνητικές επιπτώσεις στην ποιότητα του σπέρματος (Ho Kang *et al.*, 2004). Για αυτό το λόγο, η διατήρηση του σπέρματος ωαρίων, έχει γίνει μια απολύτως απαραίτητη εναλλακτική λύση στην επιλογή των ψαριών και για τον συγχρονισμό της διαθεσιμότητας των γαμετών (Rurangwa *et al.*, 2004).

Παρόλα αυτά, οι χειρισμοί του σπέρματος πριν την αποθήκευση, είναι γνωστό ότι μειώνουν την ικανότητα του να γονιμοποιήσει τα ωάρια. Η ανάμιξη του σπέρματος από διαφορετικά αρσενικά, είναι μια πολύ κοινή πρακτική στην εκτροφή πολλών εμπορικών ειδών (Bekkevold *et al.*, 2002). Με αυτή την τεχνική, ενώ η επιτυχία της γονιμοποίησης μοιάζει υψηλή, είναι πιθανό να μην συνεισφέρουν ισότιμα όλα τα αρσενικά στην «δεξαμενή» των γονιδίων, κατά τον ανταγωνισμό του σπέρματος (Babiak *et al.*, 1998). Εάν αυτή η ποσότητα σπέρματος, προέρχεται από ένα μικρό αριθμό αρσενικών, υπάρχει το ρίσκο του μεγάλου γενετικού περιορισμού και της ομομιξίας, η οποία τελικά θα οδηγήσει στην παραγωγή ομογαμικών στελεχών (Rurangwa *et al.*, 2004). Σε είδη με μεγάλη γονιμότητα, για τα οποία ένα απλό ζευγάρι μπορεί να διασφαλίσει την προέλευση ενός πληθυσμού, υπάρχει πιθανότητα να προκληθεί μειωμένη γενετική ποικιλότητα και μείωση του ποσοστού ετεροζυγωτίας, εξαιτίας της ενδογαμίας (Oteme, 1998).

Πολλές έρευνες, έχουν δείξει τη σχέση που υπάρχει, ανάμεσα στον αριθμό των ετερόζυγων γονιδιακών τόπων ενός ατόμου και την εξασφάλιση των βιολογικών του χαρακτηριστικών, όπως του ρυθμού αύξησης και της κατανάλωσης οξυγόνου, καθώς και του ποσοστού απώλειας βάρους, κατά τη διάρκεια της νηστείας. Γενικά, τα ετερόζυγα άτομα έχουν έναν πιο αποτελεσματικό μεταβολισμό, από ότι είναι αυτός των ομόζυγων (Oteme, 1996).

Σε κάποιες περιπτώσεις υδατοκαλλιεργειών, είναι πλεονεκτικό να χρησιμοποιείται μικρή αναλογία αρσενικών προς θηλυκούς γεννήτορες και αυτός ο χαμηλός αριθμός των αρσενικών που χρησιμοποιείται, να επιλέγεται μέσω γενετικής επιλογής. Για παράδειγμα, είναι ιδιαίτερα δαπανηρό να διατηρούνται αρσενικά από ορισμένα είδη, τα οποία έχουν αργή γεννητική ωριμότητα, όπως το στουργιόνι της Σιβηρίας (*Acipenser baeri*, Brandt, 1869), στο οποίο το αρσενικό ωριμάζει αναπαραγωγικά σε ηλικία τουλάχιστον 5 - 6 ετών ή το *Huso huso* (Linnaeus, 1758), στο οποίο ωριμάζουν στα 17 περίπου χρόνια. Όταν ένας μικρός αριθμός αρσενικών γεννητόρων χρησιμοποιείται, είναι κατά συνέπεια ιδιαίτερα σημαντικό να διασφαλιστεί, ότι η ποιότητα του σπέρματος είναι καλή για όλα τα αρσενικά και ότι όλα συνεισφέρουν ισότιμα, στην δεξαμενή γονιδίων (Rurangwa *et al.*, 2004).

2. ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΣΤΑ ΨΑΡΙΑ

2.1. Ορισμός Ποιότητας Σπέρματος

Η ποιότητα του σπέρματος, είναι μια μέτρηση της ικανότητας του να γονιμοποιήσει επιτυχώς ένα ωάριο. Οποιαδήποτε μετρήσιμη φυσική παράμετρος, η οποία άμεσα σχετίζεται με την αναπαραγωγική ικανότητα του σπέρματος, μπορεί πιθανώς να χρησιμοποιηθεί, σαν μέτρο της ποιότητας του (Rurangwa *et al.*, 2004).

Η ποιότητα του σπέρματος ποικίλει και εξαρτάται από διάφορους εξωτερικούς παράγοντες, όπως το καθεστώς διατροφής η ποιότητα της τροφής και η θερμοκρασία εκτροφής των ψαριών (Adewumi *et al.*, 2005).

Μεγάλες διαφορές στην ποιότητα του σπέρματος, έχουν βρεθεί ανάμεσα στα διάφορα αρσενικά, αλλά ακόμη και στο σπέρμα του ίδιου ατόμου. Οι λόγοι αυτής της μεταβλητότητας, δεν είναι ακόμη, απόλυτα, φανεροί. Η ποιότητα του σπέρματος πρέπει να αξιολογείται, όταν γίνονται προσπάθειες για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της τεχνητής αναπαραγωγής, για την κρυοδιατήρηση μόνο υψηλής ποιότητας σπέρματος και για την εκτίμηση του κατεψυγμένου – αποψυγμένου σπέρματος (Zilli *et al.*, 2004). Επίσης, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας φυσικής επιλογής, ο αριθμός και τα χαρακτηριστικά των σπερματοζωαρίων θα πρέπει να βελτιστοποιηθούν, έτσι ώστε να μεγιστοποιηθεί η καταλληλότητα του κάθε αρσενικού, σε σχέση με την ιδιαίτερη αναπαραγωγική στρατηγική του κάθε είδους (Rurangwa *et al.*, 2004).

Στη φύση, τα αρσενικά βρίσκονται σε ανταγωνισμό, ο οποίος εξαρτάται από την αναπαραγωγική στρατηγική και το φυσικό περιβάλλον του κάθε είδους (Rurangwa *et al.*, 2004). Ο Parker (1990) καθόρισε τον ανταγωνισμό σπέρματος, σαν τον αγώνα μεταξύ των σπερματοζωαρίων δυο ή περισσότερων ψαριών, για την γονιμοποίηση του ωαρίου. Επίσης, διατύπωσε την άποψη, ότι οι προσαρμογές πολλών αρσενικών, μορφολογικά, φυσιολογικά και σε σχέση με τη συμπεριφορά τους, γίνονται για να βελτιώσουν την επιτυχία του σπέρματος τους, ενάντια σε αυτό των αντιπάλων

του. Αυτές οι προσαρμογές, ίσως, αφορούν τα σπερματοζώαρια (διαμέσου της ποικιλίας στο μέγεθος, τον αριθμό και τη δομή τους), τα αναπαραγωγικά όργανα και τη συμπεριφορά τους, όπως την επιθετικότητα, την "έρωτοτροπία" και το ζευγάρωμα (Taborsky, 1998). Έτσι, για παράδειγμα, άτομα του είδους τελεόστεοι, εμφανίζουν διαφορές στον τύπο και την ποσότητα του σπέρματος τους (Rurangwa *et al.*, 2004).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, μια διαδικασία όπως αυτή του ανταγωνισμού του σπέρματος, μπορεί να ωθήσει το κάθε άτομο στην παραγωγή υπερεπάρκειας σπέρματος, ώστε να διασφαλιστεί η γονιμοποίηση. Στην ιχθυοκαλλιέργεια, παρόλα αυτά, διαφορετικά χαρακτηριστικά μπορεί να απαιτούνται, για την επιτυχή τεχνητή γονιμοποίηση. Αυτή η τεχνική, βασίζεται κυρίως στην χρησιμοποίηση μιας πολύ μεγάλης ποσότητας σπέρματος, αναμεμιγμένο με ωάρια, σε ένα μικρό όγκο υγρού. Παρόλο που αυτό είναι "σπάταλο", εάν η ποιότητα βρίσκεται κάτω από ένα ελάχιστο όριο, τότε το ποσοστό γονιμοποίησης μπορεί να μειωθεί πολύ γρήγορα, ακόμη και κάτω από αυτές τις συνθήκες (Kime *et al.*, 2001). Επιπλέον, εάν ανάμεικτες παρτίδες σπέρματος χρησιμοποιούνται, οι διαφορές στην ποιότητα του σπέρματος, μπορεί να προκαλέσουν την μείωση του πληθυσμού και της γενοτυπικής ποικιλότητας, καθώς μόνο το υψηλής ποιότητας σπέρμα θα προκαλέσει γονιμοποίηση και, όπως έχει αναφερθεί είναι δύσκολο να εξακριβωθεί η σχετική επιτυχία κάθε αρσενικού (Rurangwa *et al.*, 2004).

Ίσως η πιο σημαντική κινητήρια δύναμη, πίσω από την εύρεση εφαρμόσιμων μέτρων ποιότητας σπέρματος, εκτός από την αναπαραγωγική ικανότητα, είναι να υπάρχει ένα χαρακτηριστικό, το οποίο να μπορεί να εκτιμηθεί σε κάθε "παρτίδα" σπέρματος, χωρίς την ανάγκη των ωαρίων. Αυτό θα καθιστά ικανή την ανάλυση του σπέρματος πριν την γονιμοποίηση και θα παρακάμψει τις πρακτικές δυσκολίες της χρήσης σπέρματος στα τεστ γονιμότητας (Rurangwa *et al.*, 2004). Επίσης, δεν υπάρχει ακόμη μια μοναδική μέθοδος, που θα παρέχει ολοκληρωμένες πληροφορίες για την ποιότητα του σπέρματος. Μια αξιόπιστη, απλή και γρήγορη μέθοδος εκτίμησης της ποιότητας του σπέρματος, θα αποδειχτεί ιδιαίτερα ωφέλιμη για την υδατοκαλλιέργεια (Zrimsek *et al.*, 2004).

Υπάρχει, επομένως, ένα κίνητρο για την μέτρηση και άλλων παραμέτρων ή βιολογικών μαρκών της ποιότητας σπέρματος, οι οποίες έχουν

τεκμηριωθεί μέχρι τώρα και περιλαμβάνουν, π.χ. τον σπερματοκρίτη, την πυκνότητα σπέρματος, την οσμωτική πίεση, το pH και τη χημική σύνθεση σπερματικού πλάσματος, την ενζυμική δραστηριότητα, τη συγκέντρωση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), την κινητικότητα, τη μορφολογία και την υφή των υπερμικροσκοπικών σωματιδίων και πολλά άλλα (Chowdhury & Joy, 2001). Επειδή οι έρευνες που περιγράφουν τα χαρακτηριστικά του σπέρματος, τα οποία είναι ικανά να επηρεάσουν την ικανότητα γονιμοποίησης, έχουν δείξει μεγάλη, κατά άτομο, ποικιλία στις παραμέτρους που εξετάστηκαν, αυτό καθιστά δύσκολη τη χρήση ενός και μόνο χαρακτηριστικού, ώστε να προσδιοριστεί η καλή ποιότητα σπέρματος (Rurangwa *et al.*, 2004).

2.2 Γενικά χαρακτηριστικά του σπέρματος ψαριών

Τα σπερματοζωάρια των ψαριών αποθηκεύονται στο σπερματικό πλάσμα, το οποίο βρίσκεται στους γεννητικούς αδένες και σε αντίθεση με αυτό των θηλαστικών, είναι μη-κινητικό κατά την έκκριση (Rurangwa *et al.*, 2004). Κατά τη διάρκεια της φυσικής ωοτοκίας των ψαριών με εξωτερική γονιμοποίηση, τα ωάρια γονιμοποιούνται στο νερό. Μόνο όταν έρχονται σε επαφή με το νερό, τα σπερματοζωάρια γίνονται κινητικά, εμφανίζοντας κλιμακούμενες και ταλαντωτές κινήσεις. Έτσι, το νερό θεωρείται ότι ενεργοποιεί τα σπερματοζωάρια (Winnicki & Tomasik, 1976).

Στα περισσότερα είδη των εσωτερικών υδάτων, τα σπερματοζωάρια συνήθως κινούνται για λιγότερο από 30 δευτερόλεπτα (Kime *et al.*, 2001). Μερικά είδη ψαριού, όπως το *Anarhichus minor* (Olafsen, 1772), τα οποία χαρακτηρίζονται από την απελευθέρωση ωαρίων σε μια κολλώδη, ζελατινώδη μάζα, έχουν σπέρμα το οποίο παραμένει κινητικό για μια πολύ μεγαλύτερη χρονική περίοδο, μετά την απελευθέρωση (Kime & Tveiten, 2002). Σε αυτά τα είδη, το σπέρμα έχει χαρακτηριστικά, τα οποία διαφέρουν σημαντικά από το σπέρμα των άλλων ειδών ψαριού. Το σπέρμα τους είναι κινητικό κατά την αποβολή του και παραμένει έτσι για 1-2 ημέρες, ενώ γίνεται μη-κινητικό, όταν έρθει σε επαφή με θαλασσινό νερό. Παρόμοια χαρακτηριστικά έχουν επίσης βρεθεί στο Ocean pout (*Macrotoarces americanus*, Bloch and Schneider,

1801), ένα είδος το οποίο χαρακτηρίζεται από εσωτερική γονιμοποίηση (Kime *et al.*, 2001). Τα σπερματοζωάρια αυτών των ψαριών παραμένουν κινητικά στο σπερματικό υγρό ή σε διάλυμα σπέρματος, για πάνω από 5 ημέρες στους 4° C, χωρίς να χάσουν το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας τους. Οι γαμέτες των χονδρόστεων ειδών, όπως τα στουργιόνια και οι σπάτουλες, διαφέρουν από το γενετικό μοντέλο των τελεόστεων, καθώς σε αυτά υπάρχει σπέρμα με ακρόσωμα και ωάρια με μεγάλο αριθμό μικροπυλών (Rurangwa *et al.*, 2004).

Ο πυρήνας του σπερματοζωαρίου, είναι η λέξη κλειδί του κυττάρου και η ακεραιότητα του, θεωρείται σαν ο πιο σημαντικός δείκτης της ποιότητας του σπέρματος. Ο πυρήνας ενός κανονικού σπερματοζωαρίου, έχει μια πολύ συμπυκνωμένη χρωματίνη, που σχηματίζεται σε συνεργασία της διπλής αλυσίδας του DNA με πρωτεΐνες, πρωταμίνη και ιστόνη. Η συμπυκνωμένη και αδιάλυτη φύση της χρωματίνης του σπέρματος, προστατεύει την γενετική ακεραιότητα κατά τη διάρκεια της μεταφοράς του πατρικού γενότυπου. Μετατροπή της κεφαλής του σπέρματος, μπορεί να αντανakλά ανωμαλίες στο περιεχόμενο του DNA στα σπερματοζωάρια (Nunez- Martinez *et al.*, 2005).

Η παραγωγή του σπέρματος έχει υπολογιστεί ποσοτικά σε διάφορα είδη. Στο ψάρι λεβιστής (*Poecilia reticulata*, Peters, 1859), με συνεχή σπερματογένεση, ο αριθμός των σπερματοζωαρίων που ελευθερώνονται είναι $150 \times 10^6 \text{ gr}^{-1}$ αναπαραγωγικού αδένα, ανά ημέρα. Στα είδη ψαριών που έχουν μια εποχιακή αναπαραγωγή, όλη η ποσότητα που παράγεται βρίσκεται στον αναπαραγωγικό αδένα, ακριβώς πριν την έναρξη της έκκρισης σπέρματος. Το μέγεθος του αναπαραγωγικού αδένα είναι ένας καλός δείκτης της ικανότητας σπερματογένεσης και είναι αρκετά μεταβλητό, ανάλογα με το είδος και το μέγεθος, και μπορεί να ποικίλει από 0.2%, έως 10% του σωματικού βάρους. Η ολική παραγωγή στην ιριδιζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792), είναι 58×10^9 σπερματοζωάρια gr^{-1} αναπαραγωγικού αδένα, ανά ημέρα, αλλά η ποσότητα που ελευθερώνεται, διαφέρει από 20 έως 50%. Ο αριθμός των σπερματοζωαρίων ανά ml σπέρματος ποικίλει από 2×10^6 , έως 6.5×10^{10} (Billard *et al.*, 1995).

3. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΣΤΑ ΨΑΡΙΑ

3.1 Εισαγωγή

Ιστορικά, το ενδιαφέρον στην ανάπτυξη «εργαλείων» για να εκτιμηθεί η ποιότητα του σπέρματος των ψαριών, έχει προκύψει για διάφορους σκοπούς, που περιλαμβάνουν την ανάγκη της βελτίωσης των μεθόδων τεχνητής αναπαραγωγής, την διατήρηση των αρσενικών γαμετών και πιο πρόσφατα, για να μελετηθεί η επίδραση της έκθεσης σε μόλυνση του περιβάλλοντος, στην επιτυχία της αναπαραγωγής των ψαριών (Rurangwa *et al.*, 2004). Επίσης, τα τελευταία χρόνια ένας αριθμός διαφορετικών τεστ έχει αναπτυχθεί, για την απόκτηση περισσότερων πληροφοριών, όσον αφορά στο αποτέλεσμα μιας διαδικασίας κατάψυξης – απόψυξης (Nunez-Martinez *et al.*, 2005).

Η εκτίμηση της ποιότητας του σπέρματος, παραδοσιακά, αξιολογείται από την κινητικότητα και την πυκνότητα του σπέρματος. Εναλλακτικές μέθοδοι για τον υπολογισμό της ποιότητας του σπέρματος, έχουν αναπτυχθεί κατά τις τελευταίες δεκαετίες και επιτρέπουν την εκτίμηση της μορφολογίας της κεφαλής των σπερματοζωαρίων, της ακεραιότητας της μεμβράνης και της λειτουργίας των μιτοχονδρίων (Asturiano *et al.*, 2006). Παρόλο που διάφορες απλές και περίπλοκες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί, δεν αποδίδουν πάντα την ικανότητα γονιμοποίησης του σπέρματος, η οποία αποτελεί το τελικό κριτήριο της ποιότητας του (Rurangwa *et al.*, 2004).

Το σπερματοζωάριο είναι ένα περίπλοκο και πολύ ειδικευμένο κύτταρο, προσαρμοσμένο στην μεταφορά του γενότυπου των αρσενικών, για την γονιμοποίηση του ωαρίου. Εξαιτίας της πολυπλοκότητας του, ένα απλό τεστ δεν μπορεί να δώσει ολοκληρωμένες πληροφορίες, σχετικά με τη δυνατότητα γονιμοποίησης ενός δείγματος και διάφορα τεστ είναι αναγκαίο να διεξαχθούν (Nunez- Martinez *et al.*, 2005).

3.2 Ικανότητα γονιμοποίησης

Μέχρι σήμερα, η πιο συνηθισμένη μέθοδος για την εκτίμηση της ποιότητας του σπέρματος, είναι απλά να αναμείξουμε ωάρια και σπέρμα και

να γίνει εκτίμηση της γονιμοποίησης ή του ποσοστού εκκόλαψης (Kime *et al.*, 2001). Η δυνατότητα γονιμοποίησης των αρσενικών εξαρτάται από την ποιότητα του σπέρματος ή πιο αναλυτικά, από την πυκνότητα και την κινητικότητα του σπέρματος. Η πυκνότητα και η κινητικότητα πρέπει να εξεταστούν χωριστά, για να εκτιμηθεί η συνεισφορά του καθενός, στην δυνατότητα γονιμοποίησης (Trippel, 2003).

Η ικανότητα γονιμοποίησης είναι το πιο αξιόπιστο τεστ της ποιότητας του σπέρματος και χρησιμοποιείται στις περισσότερες έρευνες τεχνητής γονιμοποίησης και διατήρησης σπέρματος. Παρόλα αυτά, εμπεριέχει ένα ανεξάρτητο παράγοντα, ο οποίος είναι η ποιότητα των ωαρίων και η αλληλεπίδραση μεταξύ των γαμετών (Billard *et al.*, 1995). Για αυτό το λόγο, οι έμμεσες μετρήσεις της ποιότητας σπέρματος, χρησιμοποιώντας την ικανότητα γονιμοποίησης του, ίσως να μην είναι αξιόπιστες, επειδή η ποιότητα των ωαρίων διαφέρει και επηρεάζει την επιτυχία της γονιμοποίησης. Η διαθεσιμότητα ωαρίων την ίδια χρονική περίοδο με αυτή του σπέρματος, μπορεί να περιορίσει τον χρόνο κατά τον οποίο τα τεστ ποιότητας διεξάγονται. Άλλοι παράγοντες, όπως ο αριθμός των σπερματοζωαρίων ανά ωάριο, η διάρκεια της επαφής μεταξύ των γαμετών ή το χρησιμοποιούμενο πρωτόκολλο γονιμοποίησης, μπορούν, επίσης, να επηρεάσουν την επιτυχία της γονιμοποίησης (Kime *et al.*, 2001).

Μια από τις πιο σημαντικές χρήσεις των τεστ γονιμοποίησης, είναι να ελέγχουν την εγκυρότητα των άλλων μετρήσεων της ποιότητας του σπέρματος (Rurangwa *et al.*, 2004). Για παράδειγμα, η κινητικότητα του σπέρματος και η ικανότητα γονιμοποίησης, είτε του φρέσκου, είτε του κατεψυγμένου - αποψυγμένου σπέρματος, έχουν άμεση σχέση στην ιριδίζουσα πέστροφα, τον κοινό κυτρίνο (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758), το Αφρικανικό γατόψαρο (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822) και στο *Atlantic halibut* (*Hippoglossus hippoglossus*, Linnaeus, 1758) (Tvedt *et al.*, 2001).

Επίσης, το ποσοστό των κινητικών σπερματοζωαρίων σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα γονιμοποίησης στο σπέρμα του λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758). Παρόλα αυτά, υπάρχουν πάρα πολλές έρευνες στις οποίες κινητικά, γ-ακτινοβολημένα ή κρυοδιατηρημένα σπερματοζωάρια δεν ήταν γόνιμα. Μέχρι σήμερα, μόνο λίγοι ερευνητές, έχουν

ερευνήσει βιομάρκες για την ικανότητα γονιμοποίησης του σπέρματος. Στον σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*, Linnaeus, 1758), η ποιότητα του σπέρματος και τα ποσοστά νατρίου, καλίου, γλυκόζης, αλλά και η αναλογία νατρίου προς καλίου, έχουν θετικό συσχετισμό με το ποσοστό γονιμοποίησης. Στην ιριδίζουσα πέστροφα, η ποιότητα του σπέρματος και η ενεργητικότητα της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης, σχετίζονται με το ποσοστό γονιμοποίησης (Zilli *et al.*, 2004).

Το ποσοστό γονιμοποίησης του σπέρματος της ιριδίζουσας πέστροφας, έχει περιγραφεί από 3 μοντέλα. Το πρώτο περιλαμβάνει παραμέτρους του σπερματικού πλάσματος (pH, b-d-γλυκουρονιδάση και ολικά λιπίδια), η δεύτερη περιλαμβάνει παραμέτρους του μεταβολισμού του σπέρματος (ενεργητικότητα της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης, δραστηριότητα αναπνοής και ολικά λιπίδια) και το τρίτο περιλαμβάνει παραμέτρους της κινητικότητας του σπέρματος (ποσοστό κινητικότητας και ολική κολυμβητική ταχύτητα) (Zilli *et al.*, 2004).

3.3 Σπερματοκρίτης και πυκνότητα σπέρματος

Η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων στο σπέρμα, χρησιμοποιείται συχνά για να χαρακτηρίσει το σπέρμα (Billard *et al.*, 1995). Ο σπερματοκρίτης θεωρείται μια βιολογική μέθοδος της εκτίμησης της ποιότητας του σπέρματος (Moczarski & Koldras, 1982) και ορίζεται ως ο όγκος των σπερματοζωαρίων, σε αναλογία με τον ολικό όγκο του σπέρματος (Winnicki & Tomasik, 1976).

Ο σπερματοκρίτης, εκτιμάται έπειτα από την φυγοκέντρωση του σπέρματος. Όμως, με αυτή τη διαδικασία, δεν υπολογίζεται αναγκαία ο αριθμός των σπερματοζωαρίων, όπως φαίνεται στο καλκάνι, επειδή ο όγκος του σπέρματος, μπορεί να αλλάζει κατά τη διάρκεια του χρόνου (Billard *et al.*, 1995).

Τα διάφορα είδη ψαριών, έχει βρεθεί ότι παράγουν πολύ διαφορετικές ποσότητες σπέρματος, σε ένα χρονικό διάστημα (Moczarski & Koldras, 1982), ενώ οι Zheng & Stacey (1996), ανέφεραν ότι αύξηση του όγκου σπέρματος στους τελεόστεους, μπορεί να επιτευχθεί, με την χορήγηση

αυξημένων συνθετικών αναλόγων. Γενικά, τα αρσενικά που βρίσκονται σε καλή κατάσταση πριν την αναπαραγωγική περίοδο, μπορεί να είναι ικανά να παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα σπέρματος ή σπέρμα με μεγαλύτερη ενεργητική ικανότητα (Casselman & Montgomerie, 2004). Ο κοινός κυπρίνος, παράγει 6.5 cm^3 σπέρματος. Ο μέσος όρος του σπέρματος που απεκκρίνει το γλύνι (*Tinca tinca*, L. 1758) είναι 1.58 cm^3 και το χέλι από $0.57 - 1.12 \text{ cm}^3$ (Moczarski & Koldras, 1982).

Ο ολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων, είναι ένας δείκτης της δυννητικής γονιμότητας των αρσενικών. Η τιμή του τείνει να ποικίλει και εξαρτάται από το κάθε είδος. Το αρσενικό του *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum, 1792), παράγει 115 δισεκατομμύρια σπερματοζωάρια, ενώ το αρσενικό *Oncorhynchus keta* (Walbaum, 1792) παράγει 93 δισεκατομμύρια. Ο ολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων στον κορέγονο (*Coregonus lavaretus*, Linnaeus, 1758) είναι 84 δισεκατομμύρια, ενώ ο κυπρίνος είναι λιγότερο παραγωγικός, με 58 δις (Moczarski & Koldras, 1982).

Η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων στο σπερματικό υγρό, χρησιμοποιείται παραδοσιακά για την εκτίμηση της ποιότητας του σπέρματος στα ψάρια. Η καθορισμένη μέθοδος για τον προσδιορισμό της πυκνότητας του σπέρματος των ψαριών (κύτταρα σπέρματος / ml σπέρματος), είναι να μετρηθούν τα σπερματοζωάρια, χρησιμοποιώντας ένα αιμοκυτταρόμετρο. Επειδή η μέθοδος αυτή είναι χρονοβόρα, η φυγοκέντρωση, για να υπολογιστεί ο σπερματοκρίτης (% το ποσοστό του όγκου του λευκού συμπιεσμένου υλικού, προς τον ολικό όγκο του σπέρματος $\times 100$) και το φασματόμετρο, για να υπολογιστεί η οπτική πυκνότητα, χρησιμοποιούνται για τον γρήγορο προσδιορισμό της πυκνότητας του σπέρματος. Μια άμεση σχέση μεταξύ της πυκνότητας του σπέρματος και της οπτικής πυκνότητας ή του σπερματοκρίτη των ψαριών, έχει εξακριβωθεί στο *O. kisutch* και σε άλλα είδη. Στο καλκάνι, παρόλα αυτά, η πυκνότητα του σπέρματος σχετίζεται με την οπτική πυκνότητα, αλλά όχι και με τον σπερματοκρίτη (Rurangwa *et al.*, 2004).

Η ακρίβεια και σαφήνεια στις μετρήσεις του σπερματοκρίτη, εξαρτάται από την ευχέρεια στο γέμισμα της πιπέτας (Tvedt *et al.*, 2001). Επίσης, ο τύπος της συσκευής που χρησιμοποιείται για την μέτρηση των κυττάρων του σπέρματος, μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα που θα ληφθούν. Για παράδειγμα, διαφορές στα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί, όταν

χρησιμοποιείται μετρητής Coulter, σε σύγκριση με αυτά που λαμβάνονται με τη χρήση κυτταρόμετρου ροής (Rurangwa *et al.*, 2004).

Ενώ στα περισσότερα είδη ψαριών, μετά την φυγοκέντρωση, υπάρχει μια καθορισμένη επιφάνεια, μεταξύ του συμπυκνωμένου σπέρματος και του καθαρού σπερματικού υγρού, στην πέρκα (*Perca flavescens.*, Mitchell, 1814) δεν εμφανίζεται ακριβής διαχωρισμός μεταξύ αυτών των φάσεων, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε ένα λανθασμένο υπολογισμό του σπερματοκρίτη (Ciereszko & Dabrowski, 1993). Ο σπερματοκρίτης και το ιξώδες του σπέρματος, επίσης, ποικίλει μεταξύ των αρσενικών διάφορων ειδών, αλλά και κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου (Rakitin *et al.*, 1999). Στην ιριδίζουσα πέστροφα και στον κοινό κυπρίνο, η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων μειώνεται, καθώς η αναπαραγωγική περίοδος εξελίσσεται, ενώ στο *Acipenser fulvescens* (Rafinesque, 1817), ο σπερματοκρίτης αλλάζει από χρόνο σε χρόνο (Rurangwa *et al.*, 2004).

Έως και σήμερα, παρατηρείται έλλειψη καθορισμού στην μονάδα, στην οποία η πυκνότητα του σπέρματος μπορεί να εκφράζεται. Η συγκέντρωση του σπέρματος υπολογίζεται, είτε βάσει του αριθμού των κυττάρων του σπέρματος ανά κιλό βάρους σώματος (κύτταρα kg^{-1}), είτε ανά γραμμάριο του αναπαραγωγικού αδένα, είτε ανά ψάρι (κύτταρα ψάρι^{-1}). Παρόλο που ο αριθμός των σπερματοζωαρίων ανά ml σπέρματος είναι πιο κατάλληλος, πρέπει να συμπληρώνεται και από τον συνολικό όγκο του σπέρματος (Rurangwa *et al.*, 2004).

Υψηλής συγκέντρωσης σπέρμα, δεν δίνει πάντοτε την υψηλότερη κινητικότητα ή το υψηλότερο ποσοστό γονιμοποίησης (Geffen & Evans, 2000). Μέθοδοι, όπως η μέτρηση της πυκνότητας των σπερματοζωαρίων στο σπέρμα, επιτρέπουν την εκτίμηση του συνολικού πληθυσμού αυτών, χωρίς να λαμβάνουν υπόψη την κατάσταση του καθενός από αυτά. Αυτό μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις, όταν χρησιμοποιείται αναμεμιγμένο σπέρμα από πολλά αρσενικά, επειδή το σπερματοζωάριο που τελικά θα γονιμοποιήσει το ωάριο, μπορεί να έχει ανταγωνιστικά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων. Πρέπει, παρόλα αυτά, να σημειωθεί, ότι η συγκέντρωση του σπέρματος, αποτελεί ένα σχετικά σημαντικό χαρακτηριστικό, όταν γίνεται γονιμοποίηση ωαρίων με ένα σταθερό όγκο σπέρματος, ώστε να αναλυθεί η ικανότητα γονιμοποίησης διαφορετικών ειδών σπέρματος (Rurangwa *et al.*, 2004).

3.4 Συστατικά του σπερματικού πλάσματος

Η σύσταση του σπέρματος διαφόρων ειδών ψαριών, έχει ερευνηθεί εδώ και δεκαετίες. Το σπερματικό πλάσμα και το ενζυμικό προφίλ του σπέρματος, έχει γίνει κύριο αντικείμενο μελέτης τις περασμένες δεκαετίες, κυρίως στα σολομοειδή και στα κυπρινοειδή. Η ανάλυση του πλάσματος, περιλαμβάνει ανόργανα συστατικά (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), που λαμβάνουν μέρος στην διαδικασία αποτροπής ή ενεργοποίησης της κινητικότητας και οργανικά συστατικά, τα οποία είναι ενδεικτικά του μεταβολισμού της ενέργειας (Rurangwa *et al.*, 2004). Τα πιο σημαντικά υποστρώματα και οι μεταβολίτες των μεταβολικών οδών των σπερματοζωαρίων που μελετώνται, είναι η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), η μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP), τα λιπίδια, τα λιπαρά οξέα, η γλυκόζη, η λακτόζη και η φωσφορική κρεατίνη (Gronczewska *et al.*, 2003). Τα χαρακτηριστικά του σπέρματος, δίνουν μια περιεκτική άποψη της ποιότητας του σπέρματος, αλλά δεν περιγράφουν την δυναμική του κάθε σπερματοζωαρίου στο να επιτύχει γονιμοποίηση (Rurangwa *et al.*, 2004).

Τα διάφορα διαθέσιμα στοιχεία, έδειξαν μια σημαντική μεταβλητότητα στην σύνθεση του σπερματικού πλάσματος, ανάμεσα στα είδη ψαριών. Η ιοντική σύνθεση κυμαίνεται από 103 – 140 mM Na^+ , 20 – 66 mM K^+ , 0.8 – 3.6 mM Mg^{++} και 0.3 – 2.6 mM Ca^{++} στα σολομοειδή. Στα κυπρινοειδή, τα όρια διακύμανσης είναι 94 - 107 mM Na^+ , 39 – 78 mM K^+ , 0.02 – 1.2 mM Mg^{++} και 0.3 – 12.5 mM Ca^{++} , ενώ η ιοντική σύνθεση μπορεί να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου. Τα οργανικά συστατικά είναι επίσης ευμετάβλητα και, για παράδειγμα, τα όρια σε άτομα του ίδιου είδους στο καλκάνι, είναι 8 – 220 mg lt^{-1} για την γλυκόζη, 0- 218 mg lt^{-1} για την φρουκτόζη και 0 – 40 mg lt^{-1} για την χοληστερόλη. Ομοίως, μεταβάλλεται και η οσμωτική πίεση στο σπερματικό υγρό του σπέρματος στα είδη των ψαριών (Billard *et al.*, 1995).

Στην ιριδίζουσα πέστροφα, το pH και η οσμωτική πίεση του σπερματικού υγρού, έχουν επιλεχθεί για την εξακρίβωση της καταλληλότητας του σπέρματος για κρυοδιατήρηση. Μια υψηλή συγκέντρωση της πρωτεΐνης 42kd στο σπερματικό υγρό, επίσης, σχετίζεται με μικρή ικανότητα γονιμοποίησης των κατεψυγμένων – αποψυγμένων σπερματοζωαρίων της

ιριδίζουσας πέστροφας. Η διαρροή αυτών των διαφορετικών συστατικών στο σπερματικό υγρό, αντανακλά την επίδραση της κρυοδιατήρησης στη μεμβράνη του σπέρματος (Suquet *et al.*, 2000).

3.5 Βιωσιμότητα σπέρματος και ακεραιότητα της μεμβράνης

Η βιωσιμότητα του σπέρματος είναι ένας καθοριστικός παράγοντας της ποιότητας του σπέρματος (Flajshans *et al.*, 2004). Παρόλο που η πραγματική ζωτικότητα των σπερματοζωαρίων, τελικά, καθορίζεται από την ικανότητα τους να κινηθούν και να γονιμοποιήσουν ένα ωάριο, τα σπερματοζωάρια των ψαριών έχουν επίσης εξεταστεί, χρησιμοποιώντας kit βιωσιμότητας ζωντανού / νεκρού σπέρματος. Αυτά τα τεστ βασίζονται σε ένα πρωτόκολλο διπλής χρώσης χρησιμοποιώντας χρωστικές ουσίες που φθορίζουν, σε πρωτόκολλο κυτταρόμετρου ροής και στην παρατήρηση κάτω από ένα οπτικό μικροσκόπιο (Rurangwa *et al.*, 2004).

Συχνά χρησιμοποιούμενες χρωστικές είναι, αυτή του νουκλεϊκού οξέος που διαποτίζει την μεμβράνη (SYBP 14 dye) (Papaioannou *et al.*, 1997) και μια συμβατική χρωστική νεκρών κυττάρων, το ιωδιούχο προπίδιο (PI) ή η ροδαμίνη 123 (Rhodamine 123) (Grzyb *et al.*, 2003). Όταν το σπέρμα αναμιχθεί με αυτές τις δυο χρωστικές, τα ζωντανά κύτταρα του σπέρματος με άθικτη μεμβράνη θα εμφανίσουν φθορισμό πράσινο, ενώ τα κύτταρα με μεμβράνη που έχει υποστεί ζημιά, θα εμφανίσουν φθορισμό κόκκινο. Το SYBR μπορεί να διαπεράσει την μεμβράνη του κυττάρου της κεφαλής του σπέρματος και να "χρωματίσει" το νουκλεϊκό οξύ των ζωντανών κυττάρων, ενώ το PI, δεν είναι ικανό να διαπεράσει τη μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων, αλλά είναι ικανό να διαπεράσει και να χρωματίσει τον πυρήνα του DNA, του παρηκμασμένου ή του νεκρού σπέρματος (Rurangwa *et al.*, 2004). Το Rhodamine 123, είναι ικανό να διεισδύσει και να "χρωματίσει" τα λειτουργικά μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων (Segovia *et al.*, 2000). Όταν ακολουθείται από κυτταρόμετρο ροής, επιτρέπει την εκτίμηση της αναλογίας ζωντανών / νεκρών κυττάρων. Αυτή η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς

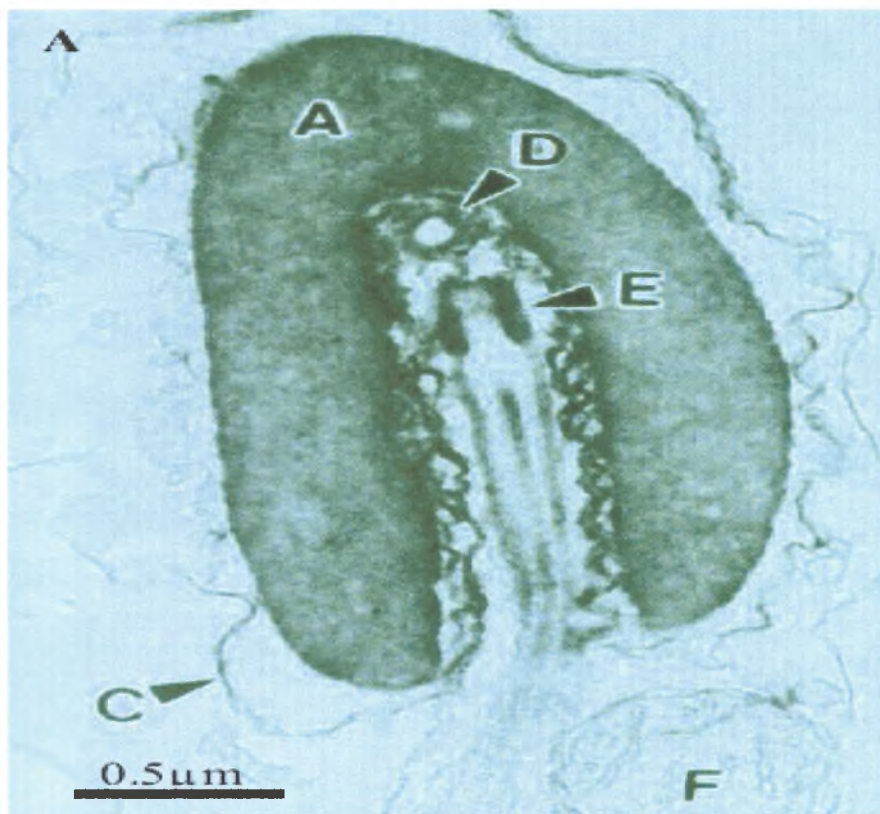
για την εκτίμηση της βιωσιμότητας των σπερματοζωαρίων, μεταξύ άλλων στον άνθρωπο, στα κουνέλια και στα ποντίκια (Flajshans *et al.*, 2004).

Το σπέρμα, μπορεί επίσης να "χρωματιστεί" με Trypan Blue και να μετρηθεί κάτω από το μικροσκόπιο για το ποσοστό των άθικτων (ζωντανών, μη "χρωματισμένων") και των σπερματοζωαρίων που έχουν υποστεί βλάβη (νεκρών - κηλιδωμένα κόκκινα) (Rurangwa *et al.*, 2002). Τέτοιες μετρήσεις χρησιμοποιούνται, ώστε απλά να εμφανίσουν την ακεραιότητα της μεμβράνης του σπέρματος, παρά την πραγματική βιωσιμότητα, επειδή, σε κάποιες περιπτώσεις, είναι πιθανό η μεμβράνη ενός σπερματοζωαρίου να είναι άθικτη και παρόλα αυτά να έχει περιορισμένη βιωσιμότητα (Rurangwa *et al.*, 2004).

3.6 Μορφολογία σπέρματος

Η γνώση της μορφολογίας του σπέρματος, βελτιώθηκε σημαντικά με την ανάπτυξη της τεχνικής του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Αρχικά, ένα ακρόσωμα υπάρχει σε όλα τα είδη ψαριών, εκτός από τους τελεόστεους. Παρόλα αυτά, σε αυτή την οικογένεια, έχει αναφερθεί προσωρινά μια δομή που μοιάζει με ακρόσωμα, όπως για παράδειγμα στο *Lepadogaster lepadogaster* (Bonnaterre, 1788), ενώ επίσης έχει αναφερθεί στην ιριδίζουσα πέστροφα, στο κουνουπόψαρο (*Gambusia affinis*, Baird & Girard, 1853) και σε άλλα. Όπως συχνά αναφέρεται, το ακρόσωμα δεν είναι απαραίτητο για την γονιμοποίηση στους τελεόστεους, εξαιτίας της παρουσίας μιας μικροπύλης, αλλά κάποιος θα περίμενε μια ειδική δομή στην κυτταρική μεμβράνη, στην κορυφή της κεφαλής του σπέρματος, για να επιτρέψει την συγχώνευση του κυττάρου κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης. Το σχήμα του πυρήνα διαφέρει πολύ και σχετίζεται με την πολυπλοκότητα της σπερματογένεσης και, ειδικότερα, της σπερμιογένεσης (Billard *et al.*, 1995). Το σχήμα της κεφαλής (Εικόνα 1) και του πυρήνα, διαφέρουν επίσης πολύ ανάμεσα στα είδη, και το μεσαίο τμήμα που περιέχει μερικά μιτοχόνδρια, είναι είτε καλά ανεπτυγμένο (λεβιστής), είτε μειωμένο (σολομοειδή, κυπρινοειδή) (Rurangwa *et al.*, 2004). Συχνά, εντοπίζεται στο οπίσθιο τμήμα του πυρήνα, αλλά μερικές φορές

βρίσκεται και στο εμπρόσθιο τμήμα. Σε κάποια πρωτόγονα σπέρματα, μπορεί να είναι σχεδόν τόσο μεγάλο, όσο και ο πυρήνας (Billard *et al.*, 1995).



Εικ. 1 Κεφαλή του σπέρματος μπακαλιάρου του Ατλαντικού (*Gadus morhua* Linnaeus, 1758) (διαμήκης τομή). A: πυρήνας, C: μεμβράνη του πυρήνα, D: κεντρίδιο, E: περιφερικό κεντρίδιο, F: μιτοχόνδρια (Trippel, 2003).

Μερικά ψάρια που εμφανίζουν εσωτερική γονιμοποίηση, όπως το είδος *Zoarces americanus* (Bloch & Schneider, 1801), έχουν σπερματοζωάρια δύο μαστιγίων, ενώ γενικά τα ψάρια έχουν εξωτερική γονιμοποίηση, έχουν ένα απλό μαστίγιο, παρόλο που μερικά σπερματοζωάρια με δύο μαστίγια έχουν αναφερθεί και στο Αμερικάνικο γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque, 1818) (Rurangwa *et al.*, 2004).

Είναι ευρέως γνωστό, ότι η μορφολογία του σπέρματος είναι ένας σημαντικός παράγοντας της ποιότητας του σπέρματος. Καθώς η κεφαλή του σπέρματος, κυρίως, περιλαμβάνει το DNA αυτού, έχει αποδειχτεί ότι ανεπαίσθητες αλλαγές στην μορφολογία του σπέρματος, ίσως σχετίζονται με μη-κανονικά περιεχόμενα του DNA (Nunez- Martinez *et al.*, 2005). Το μέγεθος

του μεσαίου τμήματος, μερικές φορές, σχετίζεται με τη διάρκεια της κινητικότητας (Billard *et al.*, 1995).

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι τα μακρύτερα σπερματοζωάρια επιτυγχάνουν ταχύτερη κολυμβητική ικανότητα (Gage *et al.*, 2002). Παρόλα αυτά, η παραμόρφωση του σπέρματος συνδέεται με λειτουργική ανεπάρκεια και προκαλεί μειωμένη κινητικότητα και ικανότητα γονιμοποίησης (Rurangwa *et al.*, 2004). Για παράδειγμα, το σπέρμα των ψαριών που απευθείας εκτίθεται σε ιόντα Hg^{2+} , χαρακτηρίζονται από ουρά που έχει υποστεί βλάβη και μειωμένη κινητικότητα και ικανότητα γονιμοποίησης. Η έκθεση του zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) σε tributyltin (TBT), στη διάρκεια μιας κρίσιμης περιόδου, στα πρώτα στάδια ζωής, έχει ως αποτέλεσμα σπέρμα χωρίς μαστίγιο, όταν αυτό φτάσει στη γεννητική του ωριμότητα (Rurangwa *et al.*, 2004).

3.7 Κινητικότητα σπέρματος

Η ποιότητα του σπέρματος, γενικά, καθορίζεται από την κινητικότητα του σπέρματος και τη δυνατότητα γονιμοποίησης (Adewumi *et al.*, 2005). Παρά τις άλλες προσεγγίσεις για την συνεκτίμηση της ποιότητας σπέρματος, η κινητικότητα είναι προϋπόθεση για την γονιμότητα και σχετίζεται άμεσα με την επιτυχία γονιμοποίησης (Rurangwa *et al.*, 2004). Άλλωστε, η κινητικότητα είναι η πιο συχνά χρησιμοποιηθείσα παράμετρος για την εκτίμηση της ποιότητας του σπέρματος (Billard *et al.*, 1995), ενώ χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ποιότητας και του φρέσκου και του κρυοδιατηρημένου σπέρματος (Liu *et al.*, 2007).

Γενικά, η μέθοδος εκτίμησης της κινητικότητας είναι αποδεκτή, γιατί το σπέρμα πρέπει να είναι κινητικό για να επιτύχει γονιμοποίηση, παρόλο που σε ορισμένες περιπτώσεις, σπέρμα που παρουσιάζει κάποια κινητικότητα, μπορεί να μην είναι γόνιμο. Το σπέρμα είναι, συνήθως, μη κινητικό στον αναπαραγωγικό αδένα και ενεργοποιείται στο εξωτερικό διάλυμα (Billard *et al.*, 1995). Στους τελεόστεους, η κινητικότητα του σπέρματος χρησιμοποιείται συχνά, για την εκτίμηση της ποιότητας του σπέρματος και της βιωσιμότητάς του, όταν τα σπερματοζωάρια εκτίθενται σε

διάφορες πειραματικές συνθήκες. Η σχέση κινητικότητας και αναπαραγωγικής ικανότητας, έχει επιβεβαιωθεί από διάφορους συγγραφείς (Lahnsteiner *et al.*, 1996). Είναι άλλωστε γνωστό ότι τα σπερματοζωάρια των ψαριών, επιδεικνύουν διαφορές ανά είδος, στην έναρξη, τη διάρκεια και την γενική εικόνα της κινητικότητας (Rurangwa *et al.*, 2004).

Το σπερματικό υγρό, όταν βρίσκεται σε συνθήκες υψηλής οσμωτικής πίεσης, σχεδόν ίδιας με αυτή του εξωτερικού περιβάλλοντος, εμποδίζει την κινητικότητα του σπέρματος στα ψάρια τα οποία έχουν εξωτερική γονιμοποίηση, όπως τα σολομοειδή (Detweiler & Thomas, 1998). Η κινητικότητα του σπέρματος στα ψάρια των εσωτερικών υδάτων, αρχίζει όταν τα σπερματοζωάρια έρχονται σε επαφή με το υδάτινο περιβάλλον και εκτίθενται σε οσμωτική πίεση, η οποία είναι πολύ χαμηλότερη από ότι αυτή στο πλάσμα του σπέρματος (Melo & Godinho, 2006) και τότε εμφανίζουν κλιμακούμενες και ταλαντωτές κινήσεις. Έτσι, το νερό θεωρείται ότι ενεργοποιεί τα σπερματοζωάρια (Winnicki & Tomasik, 1976).

Έχει βρεθεί, όμως, ότι η διαδικασία της ενεργοποίησης της κινητικότητας σε υγρό περιβάλλον, μπορεί να επιταχυνθεί, να επιβραδυνθεί, να περιοριστεί ή ακόμη και ολοκληρωτικά να σταματήσει, με την αύξηση της οσμωτικής πίεσης του υγρού. Αυτό το γεγονός, επιτρέπει την υπόθεση, ότι το νερό οσμωτικά διαπερνά ένα σπερματοζωάριο και έτσι παίζει το ρόλο διαλύματος, για τα υψηλής ενέργειας συστατικά που περιέχονται στα σπερματοζωάρια, ενώ τα ένζυμα ελευθερώνουν την απαραίτητη ενέργεια για την εμφάνιση οποιασδήποτε κίνησης (Winnicki & Tomasik, 1976).

Εάν αυτό είναι πραγματικότητα, ο ολικός όγκος των σπερματοζωαρίων αυξάνει κατά τη διάρκεια της κινητικότητας, το οποίο υποστηρίζεται και από τα ευρήματα των Beljaev (1957) και Doroser (1967), οι οποίοι μέτρησαν το μέγεθος της κεφαλής των σπερματοζωαρίων πριν και μετά την ενεργοποίηση. Ο πρώτος, κατέγραψε μια αύξηση στο μέγεθος της κεφαλής του σπερματοζωαρίου του *Misgurnus fossilis* (Linnaeus, 1758), από 1,5 - 1,8 σε 1,8 - 2,7 μm , ενώ ο δεύτερος παρατήρησε μια παρόμοια κατάσταση στο *Chalcaburnus chalcoides* (Güldenstädt, 1772), με αύξηση από 2,0 έως 5,0 - 6,0 μm . Επιπλέον, ο Doroser παρατήρησε μια αύξηση στο μέγεθος της κεφαλής των σπερματοζωαρίων που ενεργοποιήθηκαν με NaCl σε διάφορες συγκεντρώσεις (Winnicki & Tomasik, 1976).

Η διαφορά στην συγκέντρωση των ιόντων K^+ (στα σολομοειδή) ή στην οσμωτική πίεση (στα κυπρινοειδή και σε άλλες οικογένειες), μεταξύ του σπερματικού πλάσματος και του νερού, πυροδοτεί την έναρξη της κίνησης. Η οσμωτική πίεση, μοιάζει να είναι ο κυρίαρχος ελεγκτικός παράγοντας στα κυπρινοειδή, ενώ ελέγχει μερικώς την κινητικότητα στα σπερματοζωάρια στη σπάτουλα (*Polyodon spathula*, Walbaum, 1792) (Rurangwa *et al.*, 2004). Οι διαφορές που παρουσιάζονται μεταξύ των σολομοειδών και των κυπρινοειδών, στην επίδραση των ιόντων, σχετίζονται με την διαδρομή της προσαρμοστικότητας και της εξέλιξης των τελεόστεων, καθώς τα σολομοειδή θεωρείται ότι ανήκουν σε μια πρωτόγονη ομάδα αυτών (Morisawa *et al.*, 1983).

Η παρουσία υψηλών επιπέδων καλίου, επίσης, συντελεί στα αποτρεπτικά αποτελέσματα, του σπερματικού υγρού στην κινητικότητα του σπέρματος, όσον αφορά την ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων, στα σολομοειδή. Ένα mM καλίου, εμποδίζει την κινητικότητα του σπέρματος της ιριδίζουσας πέστροφας. Αντίθετα, το κάλιο προωθεί την κινητικότητα του σπέρματος και αυξάνει την κολυμβητική ταχύτητα του σπέρματος στον κυπρίνο. Το ασβέστιο παίζει σημαντικό ρόλο, στην ρύθμιση της κινητικότητας στα σολομοειδή. Η παρουσία 0.3 έως 1.0 mM ασβεστίου, ήταν επαρκής για να αντιστρέψει την παρεμπόδιση της κινητικότητας από το κάλιο, στο σπέρμα της πέστροφας (Detweiler & Thomas, 1998).

Η πολύ μικρή περίοδος της κινητικότητας του σπέρματος, που παρουσιάζεται στα περισσότερα είδη τελεόστεων (για παράδειγμα μικρότερη των 30 δευτερολέπτων στα σολομοειδή), έχει μια κρίσιμη επιρροή στην επιτυχή γονιμοποίηση, επειδή το σπερματοζωάριο πρέπει να βρει και να εισχωρήσει στην μικροπύλη, κατά τη διάρκεια αυτού του περιορισμένου χρονικού διαστήματος. Για τα μεγαλύτερα ωάρια, με διάμετρο περίπου 5 mm, όπως αυτά των σολομοειδών, ο χρόνος της κινητικότητας καθιστά ικανά τα σπερματοζωάρια να κολυμπήσουν λιγότερο από το μισό της διαδρομής (3 έως 4.9 mm) γύρω από το ωάριο. Η εξέλιξη έχει επιλέξει στρατηγικές «ζευγαρώματος», οι οποίες μεγιστοποιούν τις πιθανότητες της επαφής σπέρματος - ωαρίου, όπως το ότι οι γαμέτες των δυο ειδών ελευθερώνονται με μεγάλη γεινίαση. Παρόλα αυτά, είναι ξεκάθαρο ότι τα σπερματοζωάρια τα

οποία είναι πολύ κινητικά, θα έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες γονιμοποίησης (Rurangwa *et al.*, 2004).

Η σύνθεση του διαλύματος, στο οποίο το σπέρμα των σολομοειδών επώάζεται και αραιώνεται, επηρεάζει την κινητικότητα του σπέρματος. Για παράδειγμα, στον αναπαραγωγικό αδένα των αρσενικών, η κινητικότητα του σπέρματος μπλοκάρει από την υψηλή συγκέντρωση K^+ στο σπερματικό πλάσμα. Η ευαισθησία στο pH του σπέρματος των σολομοειδών, είναι λιγότερο ξεκάθαρη. Το pH του διαλύματος ενεργοποίησης, επηρεάζει την κινητικότητα του σπέρματος των ψαριών. Παρόλα αυτά, άλλοι ερευνητές ανέφεραν ότι οι αλλαγές στο ενδοκυτταρικό pH, δεν ρυθμίζουν την κινητικότητα του σπέρματος της πέστροφας, ενώ οι Baynes *et al.* (1981) ανέφεραν ότι η κινητικότητα του σπέρματος της πέστροφας υποχωρεί, με την ενεργοποίηση του από διάλυμα χαμηλού pH (Woolsey *et al.*, 2006).

Μια σημαντικά θετική σχέση αναφέρθηκε, ανάμεσα στο περιεχόμενο του ATP των σπερματοζωαρίων του καλκανιού και του ποσοστού των κινητικών κυττάρων (Sucuet *et al.*, 2000). Επίσης, αναφέρθηκε ότι το σπέρμα των σολομοειδών μπορεί να ενεργοποιηθεί, με την αραιώση του με όξινο νερό. Καθώς, τα διάφορα εργαστήρια χρησιμοποιούν διαφορετικά πρωτόκολλα επώασης και ενεργοποίησης, είναι πιθανόν, οι διαφωνίες που έχουν αναφερθεί για την ευαισθησία του σπέρματος στο pH, να σχετίζονται με τις διαφορές στις διαδικασίες και στα διαλύματα (Woolsey *et al.*, 2006).

Η παρατήρηση, ότι η κινητικότητα του σπέρματος αυξάνεται με την αύξηση του όγκου του σπέρματος και η στενή σχέση μεταξύ του όγκου του σπέρματος, με το ποσοστό των γονιμοποιημένων ωαρίων και το ποσοστό εκκόλαψης στο Αφρικάνικο γατόψαρο, συμφωνεί με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών (Adewumi *et al.*, 2005).

Η εκτίμηση της κινητικότητας, απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή. Σχετικά υψηλή αραιώση απαιτείται, για να ξεκινήσει συγχρονισμένα η κινητικότητα όλου του σπέρματος. Σε μικρότερη αραιώση το σπέρμα δεν ενεργοποιείται εξ ολοκλήρου και η ενεργοποίηση συμβαίνει προοδευτικά, για μερικά λεπτά μετά την αραιώση (Billard *et al.*, 1995), όπως για παράδειγμα συμβαίνει στα στουργιόνια (Alavi & Cosson, 2005). Είναι, επομένως, δύσκολο να εκτιμήσουμε ακριβώς την ένταση και τη διάρκεια της κινητικότητας του σπέρματος. Τα ανεπαρκή και ακανόνιστα επίπεδα αραιώσης, μπορούν να

εξηγήσουν πολλές από τις διαφωνίες που προκύπτουν στην βιβλιογραφία. Παρόλα αυτά, έχει αναφερθεί ότι το αυξανόμενο ποσοστό αραίωσης, μειώνει την κινητικότητα στο λαβράκι και στο καλκάνι (Billard *et al.*, 1995).

Το σπέρμα των ψαριών είναι υδαρές και, επομένως, δύσκολο να αναμιχθεί ταυτόχρονα με το διάλυμα αραίωσης, εκτός εάν το ποσοστό αραίωσης είναι πολύ υψηλό ή εάν το δείγμα έχει υποστεί έντονη ανάδευση, διαδικασία όμως, η οποία είναι επιβλαβής για το σπέρμα. Μετά την υψηλή αραίωση, ένα ομογενοποιημένο αιώρημα σπέρματος δημιουργείται, το οποίο είναι κατάλληλο για την παρατήρηση της ταυτόχρονης κινητικότητας και για την μελέτη των βιοχημικών αλλαγών, οι οποίες συμβαίνουν κατά τη διάρκεια, αλλά και μετά, την ενεργοποίηση (Billard *et al.*, 1995).

Για την πρόκληση της συγχρονισμένης κινητικότητας του 100% των σπερματοζωαρίων, απαιτείται μια διαδικασία δύο βημάτων (Suquet *et al.*, 2000), με μια αρχική αραίωση 1 προς 100 (1^η αραίωση), σε ένα διάλυμα το οποίο κρατάει τα σπερματοζωάρια μη κινητικά και επιτρέπει το καλό ανακάτεμα του ημίρρευστου σπέρματος (Billard & Cosson, 1992). Το διάλυμα αυτό, συνήθως, έχει την ίδια οσμωτική πίεση, με αυτή του σπερματικού υγρού. Η ενεργοποίηση του σπέρματος, πυροδοτείται στο δεύτερο βήμα αραίωσης (Billard *et al.*, 1995). Η δεύτερη αραίωση με το διάλυμα ενεργοποίησης (1 : 20, v / v), μπορεί να γίνει απευθείας, κατά την διάρκεια της παρατήρησης στο μικροσκόπιο. (Rurangwa *et al.*, 2004).

Ο συσχετισμός μεταξύ της σύνθεσης του σπερματικού υγρού, του μεταβολισμού των σπερματοζωαρίων και της κινητικότητας του σπέρματος δεν έχει εκτιμηθεί μέχρι σήμερα. Αυτή η σχέση, μπορεί να αποσαφηνίσει τα συστατικά του σπερματικού υγρού, τα οποία έχουν επίδραση στην κινητικότητα και να παρέχει περαιτέρω γνώση για τα μεταβολικά μονοπάτια, τα σημαντικά για την κινητικότητα και να λειτουργήσει σαν βάση για περαιτέρω έρευνες της εκτίμησης της αναπαραγωγικής ικανότητας των σπερματοζωαρίων, βασισμένη σε βιοχημικά κριτήρια (Lahnsteiner *et al.*, 1996).

Το υψηλής κινητικότητας σπέρμα, χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό γραμμικής επιτάχυνσης των κολυμβητικών σπερματοζωαρίων και υψηλή κολυμβητική ταχύτητα, όπως καταδεικνύεται από τον θετικό συσχετισμό μεταξύ αυτών των παραμέτρων. Αυτές οι τρεις παράμετροι, μπορούν να

θεωρηθούν σαν κρίσιμα σημεία στο σπέρμα του *A. alburnus* (Linnaeus, 1758), επειδή είναι αναγκαίο για τα σπερματοζωάρια να φτάσουν την μικροπύλη του ωαρίου σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα και να επιτύχουν γονιμοποίηση (Lahnsteiner *et al.*, 1996).

3.7.1 Η σύνθεση του σπερματικού υγρού και η σχέση του με την κινητικότητα

Η οσμωτική πίεση, το pH και τα επίπεδα K^+ , Na^+ (από τα οποία τα Na^+ , K^+ και η οσμωτική πίεση σχετίζονται θετικά το ένα με το άλλο), έχουν, στατιστικά σημαντικό, συσχετισμό με την κινητικότητα του σπέρματος. Χαμηλά επίπεδα αυτών των παραμέτρων, έχουν σχέση με χαμηλά ποσοστά κινητικότητας, χαμηλό ποσοστό γραμμικών κινητικών σπερματοζωαρίων και χαμηλή κολυμβητική ταχύτητα και σαν συνέπεια, τέτοιο σπέρμα, πρέπει να θεωρείται ότι είναι χαμηλής ποιότητας. Το χαμηλό pH του σπερματικού πλάσματος και η οσμωτική πίεση, καθώς και τα χαμηλά επίπεδα K^+ , Na^+ , μπορεί να προκαλούνται από μια ανεπάρκεια στο σχηματισμό του σπερματικού υγρού (Lahnsteiner *et al.*, 1996).

Ο σχηματισμός του σπερματικού υγρού (ανόργανα, όπως επίσης και οργανικά συστατικά), είναι μια ενεργητική διαδικασία έκκρισης του σπερματικού επιθήλιου πόρου και η χαμηλή οσμωτική πίεση και τα επίπεδα των K^+ , Na^+ , μπορούν να σχετίζονται με μια μειωμένη εκκριτική δραστηριότητα. Η χαμηλή οσμωτική πίεση του σπερματικού πλάσματος, μπορεί να προκαλείται από την μόλυνση του σπέρματος με ούρα, εάν η ουροδόχος κύστη δεν είναι άδεια πριν την συλλογή του σπέρματος. Το ισοτονικό σπερματικό πλάσμα καταπιέζει την κινητικότητα του σπέρματος, ενώ η χαμηλή οσμωτική πίεση μπορεί μερικώς, να ξεκινήσει την κινητικότητα του σπέρματος ή να προκαλέσει οσμωτικό στρες στα σπερματοζωάρια. Στο σολομό του Ατλαντικού, έχει αναφερθεί μια σχέση μεταξύ του ποσοστού K^+ και Na^+ του σπερματικού υγρού και του ποσοστού γονιμοποίησης των σπερματοζωαρίων και οι Aas *et al.* (1991), κατέδειξαν θετικό συσχετισμό μεταξύ του ποσοστού γονιμοποίησης και της οσμωτικής πίεσης του σπερματικού υγρού και των επιπέδων K^+ , Na^+ (Lahnsteiner *et al.*, 1996).

Η κυκλική τροχιά των σπερματοζωαρίων της ιριδίζουσας πέστροφας, της οποίας η ακτίνα μειώνεται με το πέρασμα του χρόνου μετά την ενεργοποίηση, παρακινείται από την παρουσία των ιόντων Ca^{2+} (Rurangwa *et al.*, 2004). Στο *A. alburnus*, η σημαντική σχέση, μεταξύ του pH του σπερματικού πλάσματος και του ποσοστού των κινητικών σπερματοζωαρίων, καθώς και του ποσοστού των γραμμικά κινητικά σπερματοζωαρίων, της ολικής ταχύτητας κολυμβητικής κίνησης των σπερματοζωαρίων και της ταχύτητας κολυμβητικής κίνησης των γραμμικά κινητικά σπερματοζωαρίων, αποδεικνύει ότι το pH, ίσως να είναι το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό του σπερματικού πλάσματος, το οποίο επηρεάζει την κινητικότητα του σπέρματος (Lahnsteiner *et al.*, 1996).

Τα σπερματοζωάρια της πέστροφας είναι ακίνητα στο σπερματικό υγρό, εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης σε K^+ και η ενεργοποίηση της κινητικότητας, συμβαίνει στο διάλυμα γονιμοποίησης, λόγω της αραίωσης των ιόντων K^+ . Η διάρκεια της κίνησης είναι πολύ σύντομη και η ένταση ποικίλει, κατά τη διάρκεια της φάσης της κίνησης. Η μείωση της συχνότητας κύτπου της ουράς, είναι μια άμεση συνέπεια της πτώσης της συγκέντρωσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και η χαμηλή οξειδωτική ικανότητα του ATP και η παραγωγή των μιτοχονδρίων, μοιάζει να είναι μια από τις κρίσιμες παραμέτρους που περιορίζουν την τελική διάρκεια της κίνησης του σπέρματος στην πέστροφα (Ogier de Baulny *et al.*, 1997).

Ο θετικός συσχετισμός του επιπέδου των πρωτεϊνών του σπερματικού υγρού, με το ποσοστό των γραμμικά κινητικών σπερματοζωαρίων και με την ολική κολυμβητική ταχύτητα των σπερματοζωαρίων, καταδεικνύει την επίδραση των πρωτεϊνών στην κινητικότητα του σπέρματος, πιθανώς, προστατεύοντας το σπερματικό υγρό, καθώς οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν, επίσης, θετικό συσχετισμό προς το pH. Επιπλέον, η αρνητική σχέση μεταξύ των επιπέδων της λακτάσης και του pH, ίσως, αποδεικνύει ότι το pH μειώνεται, με την αύξηση στα επίπεδα λακτάσης (Lahnsteiner *et al.*, 1996).

Η χαμηλή ή η απώλεια της δραστηριότητας των ενζύμων, μπορεί να διακόψει ή να μειώσει την αποτελεσματικότητα των μεταβολικών μονοπατιών και ως εκ τούτου, να προκαλέσουν την μείωση της παραγωγής των ενεργειακών αποθεμάτων, τα οποία είναι απαραίτητα για την κινητικότητα. Στο *A. alburnus*, ο μεταβολισμός της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και η

γλυκόληση, παίζουν σημαντικό ρόλο στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, όπως καταδεικνύεται από τη σχέση μεταξύ των ενζύμων που ανήκουν σε αυτούς τους μεταβολικούς δρόμους και των παραμέτρων της κινητικότητας. Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) έχει εξεταστεί λεπτομερώς στην ιριδίζουσα πέστροφα και είναι το κλειδί για την κίνηση της ουράς. Αυτό έχει επιβεβαιωθεί από τους Lahnsteiner *et al.* (1996), από τον αρνητικό συσχετισμό της δραστηριότητας του ATP προς το ποσοστό των μη κινητικών σπερματοζωαρίων και το θετικό συσχετισμό με το ποσοστό των κινητικών σπερματοζωαρίων και, συνεπώς, η έλλειψη της δραστηριότητας του ATP, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μη κινητικά ή χαμηλής κινητικότητας σπέρματος.

Στην ιριδίζουσα πέστροφα το pH και η οσμωτική πίεση του σπερματικού υγρού, έχουν επιλεγθεί για την εξακρίβωση της καταλληλότητας του σπέρματος για κρυοδιατήρηση και μια υψηλή συγκέντρωση της πρωτεΐνης 42kd στο σπερματικό υγρό, επίσης, σχετίζεται με μικρή ικανότητα γονιμοποίησης των αποψυγμένων σπερματοζωαρίων (Sucuet *et al.*, 2000).

Συμπερασματικά, το ποσοστό κινητικότητας του σπέρματος, παρουσιάζει μια στατιστικά υψηλή σχέση με τα συστατικά του σπερματικού υγρού. Από αυτές τις παραμέτρους, ειδικότερα το pH και η οσμωτική πίεση, είναι εύκολο να καθοριστούν χωρίς πολύπλοκες αναλυτικές τεχνικές, οι οποίες είναι απαραίτητες για τα άλλα συστατικά. Έτσι, αυτές οι παράμετροι πρέπει να εξεταστούν για την εξακρίβωση του συσχετισμού τους με το ποσοστό γονιμοποίησης και για την εκτίμηση της σημασίας τους, σαν δείκτες ποιότητας του σπέρματος (Lahnsteiner *et al.*, 1996).

4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΣΤΑ

ΨΑΡΙΑ

4.1 Εισαγωγή

Στην εμπορική παραγωγή ιχθύων, είναι απαραίτητο να γίνει εκτίμηση της ποιότητας του σπέρματος, ώστε να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της

τεχνητής αναπαραγωγής. Μια μέθοδος, η οποία μπορεί με ταχύτητα να εκτιμήσει την ποιότητα του σπέρματος και η οποία να μην εξαρτάται από την διαθεσιμότητα των ωαρίων από το θηλυκό, θα διευκολύνει σημαντικά την βελτιστοποίηση της παραγωγής και τις μεθόδους συλλογής και αποθήκευσης (Rurangwa *et al.*, 2004).

Διάφορες μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την μέτρηση της κινητικότητας, πολλές εκ των οποίων ήταν σχετικά μικρής ακρίβειας (Billard *et al.*, 1995). Η εκτίμηση της κινητικότητας του σπέρματος, ιστορικά βασίζεται σε υποκειμενικές κρίσεις των χαρακτηριστικών του, η αξία των οποίων είναι αμφισβητήσιμη στο να προβλέπει την γονιμότητα (Rurangwa *et al.*, 2004).

4.2 Υποκειμενικές μέθοδοι

Η εκτίμηση της κινητικότητας του σπέρματος ψαριών, ουσιαστικά βασίζονταν, για μεγάλο χρονικό διάστημα, σε υποκειμενικές εκτιμήσεις των χαρακτηριστικών της και, κυρίως, στο ποσοστό των κινητικών κυττάρων σπέρματος, στην συνολική διάρκεια της κίνησης ή σε ένα συνδυασμό των δύο αυτών παραμέτρων (Rurangwa *et al.*, 2004). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε πιο συχνά στο παρελθόν, ήταν η εκτίμηση της συνολικής κίνησης του σπέρματος, σύμφωνα με μια αυθαίρετη κλίμακα, συνήθως από 0 έως 5 μονάδες (Billard *et al.*, 1995). Αναλυτικότερα, από το ποσοστό των κινητικών σπερματοζωαρίων και τη δυναμική κολύμβηση αυτών, είναι δυνατή η βαθμολόγηση της κινητικότητας, που αντιστοιχεί σε μια κλίμακα με κριτήρια από το 0 (μη κινητικό), έως το 5 (όλα τα σπερματοζωάρια έντονα κινητικά) (Rurangwa *et al.*, 2004).

Η διάρκεια της κινητικότητας, αναφέρεται στην συνολική διάρκεια της κίνησης, συμπεριλαμβάνοντας την κινητοποίηση του μαστίγιου χωρίς μετατόπιση ή στη διάρκεια της εμπρόσθιας κίνησης και τον χρόνο επιβίωσης του 50% του σπέρματος. Η διάρκεια της κινητικότητας, μερικές φορές, συνδυάζεται με την εκτίμηση της έντασης της κολύμβησης. Οι πιο πρόσφατες μελέτες, αναφέρονται στο ποσοστό του κινητικού σπέρματος (Billard *et al.*, 1995).

Μερικές, λιγότερο περιγραφικές, υποκειμενικές κλίμακες, έχουν καθορίσει το ποσοστό κινητικότητας, αναφορικά με το ποσοστό των κινητικών σπερματοζωαρίων στο οπτικό πεδίο. Στο λαβράκι, η κατηγορία της κινητικότητας, χρησιμοποιείται σύμφωνα με το ποσοστό των γρήγορων, δυναμικών και κινούμενων προς τα εμπρός σπερματοζωαρίων (Billard *et al.*, 1995). Επειδή όλες αυτές οι μέθοδοι, χρησιμοποιούν αυθαίρετες, μη γραμμικές κλίμακες, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για καμία στατιστική ανάλυση. Όπως είναι αναμενόμενο, τέτοιες μετρήσεις έχουν, γενικά, οδηγήσει σε διαφορετικά αποτελέσματα μεταξύ των εργαστηρίων και η αξία αυτών των μετρήσεων κινητικότητας για την πρόβλεψη της γονιμοποίησης, είναι ακόμη υπό αμφισβήτηση. Οι υποκειμενικές εκτιμήσεις της ποιότητας σπέρματος, εξαρτώνται κυρίως από την εμπειρία των παρατηρητών, το τελικό σημείο το οποίο επιλέγεται και πως αυτές οι μετρήσεις μεταφράζονται (Rurangwa *et al.*, 2004).

4.3 Ημι-ποσοτικές μέθοδοι

Για την βελτίωση της μεθοδολογίας, η οποία χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ποιότητας σπέρματος, έτσι ώστε αυτή να γίνει αντικειμενική και ποσοτική, πρέπει να υπολογιστεί η πραγματική ταχύτητα κίνησης του σπέρματος. Για αυτό το σκοπό, αναπτύχθηκε μια μέθοδος, η οποία περιλαμβάνει την καταγραφή σε βίντεο της κίνησης του σπέρματος, μέσω ενός μικροσκοπίου, και έπειτα την επανάληψη της αναπαραγωγής της ταινίας, καρέ - καρέ. Από την μέτρηση του μήκους και από τα ίχνη του σπέρματος, είναι δυνατός ο υπολογισμός της ταχύτητας κίνησης του σπέρματος. Οι ημι - ποσοτικές μετρήσεις της κινητικότητας σπέρματος αναλύονται σε βίντεο, που παρακολουθείται από δύο ή περισσότερους ανεξάρτητους παρατηρητές, οι οποίοι εκτιμούν τις κινήσεις του σπέρματος (Kime *et al.*, 2001).

Με αυτή τη μέθοδο, μόνο τα σπερματοζωάρια που κινούνται προς τα εμπρός θεωρούνται κινητικά, ενώ αυτά που απλώς πάλλονται ή γυρνούν γύρω από τον άξονα τους, θεωρούνται μη κινητικά. Αυτές οι μέθοδοι, παρέχουν μια λιγότερο υποκειμενική μέτρηση, σε σχέση με τις περισσότερες τεχνικές βαθμολόγησης. Παρόλα αυτά, για την εκτίμηση της ποιότητας

ξεχωριστών δειγμάτων σπέρματος και για την μέτρηση της κολυμβητικής ταχύτητας, αυτή η μέθοδος είναι χρονοβόρα και είναι απαραίτητη η παρουσία και η κρίση παρατηρητών (Rurangwa *et al.*, 2004).

4.4 Ποσοτικές με τη βοήθεια υπολογιστών μέθοδοι

Η μεγαλύτερη βελτίωση στην γρήγορη και αντικειμενική εκτίμηση της κινητικότητας του σπέρματος των ψαριών, προήλθε από τη χρήση της εξελιγμένης μεθοδολογίας ανάλυσης της εικόνας για τις μετρήσεις του σπέρματος, που χρησιμοποιούνται στις κλινικές ανθρώπινης γονιμότητας (Rurangwa *et al.*, 2004). Έτσι, τα τελευταία χρόνια, η ανάλυση της κινητικότητας του φρέσκου και του κρυοδιατηρημένου σπέρματος γίνεται με τη βοήθεια της τεχνικής ανάλυσης του σπέρματος με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή (Computer-Assisted Sperm Analysis, CASA) (Liu *et al.*, 2007).

Το σύστημα CASA, είναι η εξέλιξη των πολλαπλών μικροφωτογραφικών και μικροαπεικονίσεων καταγραφής (video-micrography) τεχνικών για την ανίχνευση των σπερματοζωαρίων, χρησιμοποιώντας ένα υπολογιστή εφοδιασμένο με λογισμικό απεικόνισης. Το σύστημα CASA, αναφέρεται στο υλικό που χρησιμοποιείται για τον σχηματισμό εικόνας και την ψηφιοποίηση των στατικών και δυναμικών απεικονίσεων των σπερματοζωαρίων (Rurangwa *et al.*, 2004). Η μέθοδος αυτή, επιτρέπει την ανάλυση της καταγραφόμενης ταινίας, χρησιμοποιώντας λογισμικό, του οποίου οι δοθείσες παράμετροι, προσαρμόζονται στα χαρακτηριστικά του σπέρματος του είδους το οποίο μελετάται (Suquet *et al.*, 2000). Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, εξαρτώνται εμφανώς, από την μέγιστη ταχύτητα κίνησης των σπερματοζωαρίων, η οποία είναι η μέγιστη απόσταση που καλύπτει ένα σπερματοζωάριο, μεταξύ δύο διαδοχικών στιγμιότυπων της καταγραφής του βίντεο (Pavlov, 2006).

Ευθύγραμμες ή καμπυλόγραμμες κινήσεις, σπάνια υπολογίζονται με το CASA. Ανάμεσα στα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της κινητικότητας του σπέρματος, είναι το ποσοστό των κινούμενων κυττάρων (Suquet *et al.*, 2000). Το σύστημα CASA, προσδιορίζει ποσοτικά διάφορες παραμέτρους της κινητικότητας του σπέρματος και εκτός του ότι είναι

γρήγορο, επιτρέπει την λεπτομερή ανάλυση των χαρακτηριστικών αυτής της κίνησης. Όμως, η θερμοκρασία, το μέγεθος και η συγκέντρωση του σπέρματος, καθώς και η ταχύτητα των σπερματοζωαρίων, μπορεί να επηρεάσουν την ποιότητα των αποτελεσμάτων και πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά τη διάρκεια της διαδικασίας βαθμονόμησης (Rurangwa *et al.*, 2004).

Η μέθοδος CASA χρησιμοποιείται και για τον υπολογισμό των κυρίων παραμέτρων της κινητικότητας σπέρματος, μέσω ενός μικροσκοπίου και μιας κάμερας βίντεο, συνδεδεμένο με έναν υπολογιστή, ο οποίος διαθέτει ένα εύκολα διαθέσιμο λογισμικό (Rurangwa *et al.*, 2001).

Το σύστημα CASA αρχικά αναπτύχθηκε για να εξετάσει την ποιότητα του σπέρματος στα θηλαστικά και στα πουλιά, και εφαρμόστηκε, μόλις πρόσφατα, στο σπέρμα των ιχθύων. Η τεχνική αυτή μπορεί να παίξει έναν σημαντικό ρόλο στις υδατοκαλλιέργειες, καθώς έχει τη δυνατότητα να εξετάσει τα αποτελέσματα της χημείας του νερού και της ποιότητας της τροφής, της θερμοκρασίας των χειρισμών, της φωτοπεριόδου ή τα αποτελέσματα των συνθηκών διατήρησης στην ποιότητα του σπέρματος και επομένως, στην ικανότητα γονιμοποίησης των εκτρεφόμενων ειδών (Suquet *et al.*, 2000).

5. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

5.1 Εισαγωγή

Συχνά αναφέρεται μεγάλη διαφορά στην ποιότητα σπέρματος κατά άτομο. Αυτό μπορεί να οφείλεται, μεταξύ άλλων, στην γενετική ποικιλότητα, αλλά και στην περιοχή δειγματοληψίας, στην μόλυνση του δείγματος σπέρματος από ούρα και στην γήρανση του σπέρματος, κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου (Suquet *et al.*, 2000). Η παραγωγή σπέρματος και η ποιότητα του, επίσης, μπορεί να επηρεαστούν από την ηλικία του ψαριού, το μέγεθος και την φυσιολογική του κατάσταση (DeGraaf *et al.*, 2004), ενώ η ποιότητα του σπέρματος των εκτρεφόμενων ψαριών, μπορεί να επηρεαστεί από διάφορες συνιστώσες της διαχείρισης των γεννητόρων, κατά τη διάρκεια

της συλλογής και της αποθήκευσης του σπέρματος πριν την γονιμοποίηση ή κατά τη διάρκεια της διαδικασίας γονιμοποίησης (Bromage, 1995).

Φαίνεται ακόμη, ότι και η καταλληλότητα του σπέρματος για κατάψυξη, ποικίλει από αρσενικό σε αρσενικό και ότι σε πολλές περιπτώσεις, το αναμεμιγμένο σπέρμα διάφορων αρσενικών δίνει καλύτερο ποσοστό γονιμοποίησης, από ότι ο μέσος όρος των ξεχωριστών ατόμων (Oteme *et al.*, 1996).

Στην εκτροφή ψαριών και στα εκκολαπτήρια, οι βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα του σπέρματος, εξαρτώνται από περίπλοκες αλληλεπιδράσεις, μεταξύ των γενετικών, φυσιολογικών και περιβαλλοντικών παραγόντων (Suquet *et al.*, 2000). Η αντικειμενική εκτίμηση της ποιότητας του σπέρματος σε ένα εκκολαπτήριο, μπορεί επομένως, να προσφέρει καινοτομίες και κατατοπιστικά δεδομένα, τα οποία θα είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν, ώστε να εφαρμοστούν οι καλύτερες συνθήκες εκτροφής και οι ιδανικοί χειρισμοί για τους αρσενικούς γεννήτορες, καθώς και για την αποθήκευση των σπερματοζωαρίων πριν την γονιμοποίηση (Rurangwa *et al.*, 2004).

Στις υδατοκαλλιέργειες, τα ψάρια συνήθως κρατούνται σε μη φυσικές συνθήκες ιχθυοπυκνότητας, ταιΐζονται με συνθετικές τροφές, υπόκεινται σε χρήση αντιβιοτικών και γενικά υφίστανται στρεσογόνους παράγοντες. Επιπλέον, τα εκτρεφόμενα ψάρια είναι ειδικά επιλεγμένα, ώστε να είναι ελκυστικά στους καταναλωτές και να αναπτύσσονται με το μέγιστο δυνατό ρυθμό, με σκοπό το εμπορικό κέρδος. Τέτοια επιλογή είναι πολύ διαφορετική από την φυσική επιλογή και μπορεί να μην επιλέγονται απαραίτητα, για την καλύτερη ποιότητα και ποσότητα σπέρματος. Για την επιτυχή γονιμοποίηση, είναι βασικό το παραγόμενο σπέρμα σε ένα εκκολαπτήριο να είναι καλής ποιότητας. Είναι λογικό να προσδοκάται, ότι το σπέρμα ενός εκτρεφόμενου ψαριού, έχει χαρακτηριστικά συγκρίσιμα με τα καλύτερα που βρίσκονται στα άγρια ψάρια (Rurangwa *et al.*, 2004).

Η κατανόηση των παραγόντων που επηρεάζουν την ποιότητα του σπέρματος είναι υψίστης σημασίας, στο να τελειοποιηθούν οι μέθοδοι και οι χειρισμοί, που απαιτούνται για την επιτυχή τεχνητή γονιμοποίηση. Εάν μπορεί αντικειμενικά, να μετρηθεί η ποιότητα του σπέρματος σε αυτές τις περίπλοκες καταστάσεις, τότε θα είναι εφικτό να αποσαφηνιστούν οι πολλοί παράγοντες

που επηρεάζουν την επιτυχία της γονιμοποίησης και επιπλέον, να κατανοηθούν οι παράγοντες που μειώνουν την επιτυχία της, καθώς και προκαλούν την μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (Suquet *et al.*, 2000). Αυτοί οι παράγοντες μπορούν γενικά να ταξινομηθούν, σε αυτούς που έχουν επιπτώσεις στους γεννήτορες και σε αυτούς που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης (Rurangwa *et al.*, 2004).

5.2 Επίπτωση στους γεννήτορες

5.2.1 Φωτοπερίοδος και θερμοκρασία εκτροφής

Η φωτοπερίοδος χρησιμοποιείται στην υδατοκαλλιέργεια για να επιταχυνθεί ή να επιβραδυνθεί η γοναδιακή δραστηριότητα, έτσι ώστε τα ψάρια να ωοτοκήσουν σε “βολική”, εξυπηρετική περίοδο του χρόνου (Rurangwa *et al.*, 2004). Για παράδειγμα, σε υβρίδια *Morone chrysops* (Rafinesque, 1820) X *M. saxatilis* (Walbaum, 1792), που υποβλήθηκαν σε μετατοπισμένο φωτοπεριοδικό κύκλο (6, 9 ή 12 μήνες), η συγκέντρωση του σπέρματος, η διάρκεια της κινητικότητας και το pH του σπερματικού υγρού, παρουσίασε διαφορές ανάμεσα στα αρσενικά διαφορετικών κύκλων, αλλά αυτές οι διαφορές δεν προκάλεσαν αλλαγές στην γονιμοποίηση (Tate & Helfrich, 1998). Σε άτομα του *Anarhichas minor* (Olafsen, 1772) όμως, δεν υπάρχει διαφορά στον όγκο ή στην συγκέντρωση του σπέρματος, ανάμεσα σε αρσενικά που κρατούνται υπό δύο διαφορετικές φωτοπερίόδους και στο χρυσόψαρο, ο φωτοπεριοδικός χειρισμός δεν επηρεάζει την παραγωγή σπέρματος (Rurangwa *et al.*, 2004).

Σε ερευνητικές εργασίες που έγιναν με ιριδίζουσα πέστροφα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι εποχιακές διακυμάνσεις, επηρεάζουν έντονα την ποιότητα του σπέρματος, σε σχέση με την ικανότητα κατάψυξης. Οι διαφορές στην ικανότητα κατάψυξης μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στη σύνθεση της μεμβράνης του σπέρματος, σαν συνέπεια της διαφορετικής θερμοκρασίας κατά την οποία συμβαίνει η γαμετογένεση (Robles *et al.*, 2003).

Παρόλο που υπάρχουν ενδείξεις για εξαρτώμενο από τη θερμοκρασία καθορισμό φύλου σε μερικά εκτρεφόμενα είδη, δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά, για το πώς η θερμοκρασία εκτροφής μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του σπέρματος (Rurangwa *et al.*, 2004). Παρόλα αυτά, οι Labbe & Maisse (1996), ανέφεραν ότι η ικανότητα των σπερματοζωαρίων της ιριδίζουσας πέστροφας να αντέξει την κρυοδιατήρηση βελτιώθηκε, με την εκτροφή της σε υψηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης, που ακολουθήθηκε από μεταφορά σε νερό χαμηλότερης θερμοκρασίας.

5.2.2 Διατροφή και μολυσματικοί παράγοντες

Η βελτίωση της διατροφής των αρσενικών ατόμων, βελτιώνει σημαντικά την ποιότητα των γαμετών και την παραγωγή γόνου (Izquierdo *et al.*, 2001). Στα αρσενικά λαβράκια, ο εμπλουτισμός της διαίτας με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), αυξάνει την αναπαραγωγική απόδοση. Τα λαβράκια που τρέφονται με τροφή σε μορφή pellets, εμπλουτισμένη με ιχθυέλαια, έχουν μεγαλύτερης διάρκειας περίοδο παραγωγής σπέρματος, μεγαλύτερο όγκο σπέρματος και συγκέντρωση σπερματοζωαρίων, καθώς και υψηλότερη βιωσιμότητα των εμβρύων και των προνυμφών μετά τη γονιμοποίηση, όταν συγκριθούν με αυτά που χρησιμοποίησαν μη εμπλουτισμένες τροφές (Rurangwa *et al.*, 2004).

Η σημασία της διαίτας με ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), στην γονιμότητα των αρσενικών, έχει αποδειχθεί στην ιριδίζουσα πέστροφα (Dabrowski & Ciereszko, 1996). Η αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης C, παρέχει προστασία στα κύτταρα του σπέρματος, με το να μειώνει το ρίσκο της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, ενώ η ανεπάρκεια του ασκορβικού οξέος, μειώνει την συγκέντρωση του σπέρματος και την κινητικότητα, αλλά και την συχνότητα γονιμοποίησης (Ciereszko & Dabrowski, 1995).

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχουν αυξανόμενες αποδείξεις, ότι η μόλυνση του περιβάλλοντος, μπορεί να επηρεάσει την αναπαραγωγική ικανότητα, γενικότερα, στα άγρια ζώα (Van Look & Kime, 2003). Τα σπερματοζωάρια, δεν έχουν ικανότητα να αντισταθμίσουν τις εξωτερικές επιδράσεις και μπορεί

να είναι πολύ ευαίσθητα στις αλλαγές του περιβάλλοντος και ειδικά στην μόλυνση (Lahnsteiner *et al.*, 2004).

Η έκθεση σε τοξικές ουσίες ή ορμόνες μπορεί να επηρεάσουν την αναπαραγωγή γενικά, έχοντας ως αποτέλεσμα την μειωμένη ποιότητα σπέρματος. Σε άτομα *Acanthopagrus schlegeli* (Bleeker, 1854), τα οποία ταΐστηκαν με τροφή που περιείχε 4 mg Kg⁻¹ οιστραδιόλη-17b, προκλήθηκε καταστολή στην παραγωγή σπέρματος, για περισσότερο από 7 μήνες μετά την έκθεση (Rurangwa *et al.*, 2004). Στην ιριδίζουσα πέστροφα που ταΐστηκε με ένα φυτοοιστρογόνο (genistein), η κινητικότητα του σπέρματος και η συγκέντρωση μειώθηκε, ανάλογα με τον τρόπο γονιμοποίησης (Bennetau - Pelissero *et al.*, 2001).

Επίσης, σε άτομα *H. huso* στην Κασπία θάλασσα, παρατηρήθηκαν ασθένειες και αναπαραγωγικές ανωμαλίες, που σχετίζονται με μολυσματικούς παράγοντες, εξαιτίας της υποβάθμισης της ποιότητας του νερού, λόγω των εργοστασιακών μολύνσεων και των αστικών λυμάτων (Mims *et al.*, 2002).

5.2.3 Επίδραση του στρες στους γεννήτορες

Είναι ευρέως γνωστό, ότι η έκθεση των ψαριών σε παράγοντες που προκαλούν στρες, όπως η πολύ μεγάλη ιχθυοπυκνότητα, προκαλεί μια φυσιολογική αντίδραση, η οποία περιλαμβάνει την ταχεία αύξηση της κορτιζόλης (Noga *et al.*, 1994) και στην πραγματικότητα, το στρες που προκαλείται στα ψάρια, μπορεί να προκαλέσει καταστολή του ανοσοποιητικού τους συστήματος και να οδηγήσει σε αυξημένη ευαισθησία στις ασθένειες (Rurangwa *et al.*, 2004).

Η ποιότητα των γαμετών των ψαριών, εξαρτάται από το κατάλληλο ορμονικό περιβάλλον κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, αλλά αυτό μπορεί να διαταραχθεί από το στρες (Rurangwa *et al.*, 2004). Ενώ η απάντηση στο στρες είναι προσαρμοστική βραχυπρόθεσμα, το χρόνιο στρες είναι δύσκολο να αντιμετωπιστεί και μπορεί να οδηγήσει σε πιο σοβαρές συνέπειες, όπως στη μειωμένη ανάπτυξη, τη μικρή αντίσταση στις ασθένειες ή ακόμη και στο θάνατο των ψαριών. Η έκθεση στο στρες, μπορεί επίσης, να διαταράξει την διαδικασία αναπαραγωγής, μειώνοντας τα επίπεδα της γοναδοτροπίνης στην



υπόφυση και στο πλάσμα, καθώς και προκαλώντας την υποβάθμιση της ποιότητας των προνυμφών (Castranova *et al.*, 2005).

Τα ψάρια που κρατούνται σε αιχμαλωσία, υπόκεινται σε συνθήκες που συχνά αυξάνουν το στρες και παράγουν μειωμένη ποσότητα γαμετών. Για παράδειγμα, αυξάνοντας την συχνότητα συλλογής από 4 εβδομάδες σε 15 ημέρες, σε ιριδίζουσα πέστροφα που ωτοκεί πρώτη φορά, μειώνεται σημαντικά ο όγκος του σπέρματος σε μια αναπαραγωγική περίοδο, καθώς και η πυκνότητα και η διάρκεια της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων (De Graaf *et al.*, 2004).

Επίσης, οι συνθήκες στρες που υφίστανται τα ψάρια με την σύλληψη τους και την μεταφορά, όπως επίσης και κατά τη διάρκεια συλλογής του σπέρματος, έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στην ποιότητα του αναπαραγωγικού υλικού των αρσενικών. Αυτό υποστηρίζεται, από τα ευρήματα στο στρουγγιόνη της Σιβηρίας, στο οποίο ο βαθμός ωριμότητας, όπως επίσης ο χρόνος της απόκτησης του σπέρματος, έχουν σημαντική επίδραση στην ποιότητα του σπέρματος (Koreika *et al.*, 2000).

Κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου, τα αρσενικά άτομα του *Oncorhynchus nerka* (Walbaum, 1792), αντέδρασαν στο στρες της αιχμαλωσίας, με αυξημένα επίπεδα κορτιζόνης και γλυκόζης και μειωμένα επίπεδα των αναπαραγωγικών στεροειδών τεστοστερόνη και 11-κετοτεστοστερόνη (T και 11-KT) (Kubokawa *et al.*, 1999). Το στρες μπορεί επίσης να ενεργεί, επιφέροντας αλλαγές στην οσμωτική πίεση του πλάσματος, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του σπέρματος στα ψάρια (Rurangwa *et al.*, 2004). Για παράδειγμα, σε άτομα του *M. chrysops* που μεταφέρθηκαν σε γλυκό νερό για 5 ώρες, μειώθηκε η οσμωτική πίεση του σπερματικού υγρού και η κινητικότητα κατά την ενεργοποίηση (Allyn *et al.*, 2001).

Στην ιριδίζουσα πέστροφα, το επαναλαμβανόμενο έντονο στρες κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ανάπτυξης μείωσε σημαντικά τις μετρήσεις του σπέρματος και το σημαντικότερο, προκάλεσε ελάττωση του ποσοστού επιβίωσης στους απογόνους των στρεσαρισμένων ψαριών, σε σχέση με τα μη στρεσαρισμένα ψάρια του δείγματος ελέγχου. Επειδή πολλές από τις διαδικασίες χειρισμών και μεταφορών που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες, μπορεί να είναι δυνητικά στρεσογόνες, η ποσοτική

εκτίμηση των αποτελεσμάτων αυτών των διαδικασιών στην ποιότητα του σπέρματος μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στις συνθήκες που χρησιμοποιούνται, έτσι ώστε το στρες να ελαχιστοποιηθεί και η ποιότητα του σπέρματος να μην επηρεαστεί (Rurangwa *et al.*, 2004).

5.2.4 Ηλικία των γεννητόρων και αναπαραγωγική περίοδος

Η ηλικία των γεννητόρων έχει μια σημαντική επίδραση στην ποιότητα του σπέρματος και μπορεί να επηρεάσει την επιτυχία της αποθήκευσης του (Bromage, 1995).

Συχνά, μεγαλύτερα αρσενικά παράγουν μεγαλύτερο όγκο σπέρματος, με μεγαλύτερη πυκνότητα και μεγαλύτερη ικανότητα γονιμοποίησης, σε σύγκριση με νεότερα, λιγότερο ώριμα ψάρια. Για παράδειγμα, η συγκέντρωση του σπέρματος στο αναπαραγωγικό υλικό ενός ατόμου πέστροφας της ανάδρομης ποικιλίας, ηλικίας 4 ετών, είναι σημαντικά υψηλότερη από ότι αυτή ψαριών 2 ή 3 ετών, ενώ στην ιριδίζουσα πέστροφα οι γεννήτορες που ωοτοκούν δεύτερη φορά, έχουν μεγαλύτερο όγκο αναπαραγωγικού υλικού και μεγαλύτερη παραγωγή σπέρματος, από ότι αυτά που ωοτοκούν πρώτη φορά (DeGraaf *et al.*, 2004).

Σε εκτρεφόμενα άτομα ραβδωτού λαυρακιού (*M. saxatilis*) τα ψάρια ηλικίας 3 ετών έχουν καλύτερη ποιότητα σπέρματος, από ότι αυτά 1 ή 12 χρόνων, βασιζόμενο στην μεγαλύτερη παραγωγή σπέρματος και την αυξημένη βιωσιμότητα, κατά τη διάρκεια της βραχυπρόθεσμης αποθήκευσης (Rurangwa *et al.*, 2004).

Σε είδη ψαριών με ετήσιο αναπαραγωγικό κύκλο, η ποιότητα του σπέρματος ποικίλει στη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου, όπως επίσης και η συχνότητα αναπαραγωγής. Στον κοινό κυπρίνο (*C. carpio*), η μέθοδος CASA έδειξε ότι η παραγωγή σπέρματος και η ποιότητα του, είναι χαμηλότερη στην αρχή και στο τέλος της αναπαραγωγικής περιόδου (Christ *et al.*, 1996). Παρόμοια μείωση στην ποιότητα του σπέρματος επίσης, παρατηρήθηκε στο καλκάνι. Η ανάλυση σπέρματος μπορεί επομένως, να ορίσει επακριβώς την ιδανική περίοδο, στην οποία το σπέρμα πρέπει να συλλεχθεί (Rurangwa *et al.*, 2004).

Η γήρανση του σπέρματος στους αναπαραγωγικούς αδένες έχει περιγραφεί για πολλά είδη ψαριών και επηρεάζει την ποιότητα του, στο τέλος της αναπαραγωγικής περιόδου. Στα θαλασσινά είδη, όπως στο λαβράκι, η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων μειώνεται, όσο η αναπαραγωγική περίοδος εξελίσσεται. Τα σπερματοζωάρια αυτών των ειδών, διατηρούν την κολυμβητική τους ικανότητα για μεγαλύτερη διάρκεια στο ξεκίνημα της αναπαραγωγικής περιόδου, από ότι στο τέλος της. Επιπροσθέτως, χαμηλότερο ποσοστό κινητικότητας και γονιμοποίησης, καθώς και μειωμένη ικανότητα για βραχυπρόθεσμη διατήρηση, έχουν αναφερθεί στο τέλος της αναπαραγωγικής περιόδου. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, και η δομή του γηρασμένου σπέρματος του λαυρακιού αλλάζει (Suquet *et al.*, 2000).

Στο καλκάνι του Ατλαντικού (*Hippoglossus hippoglossus*, Linnaeus 1758), η κινητικότητα του σπέρματος μειώνεται στο τέλος της αναπαραγωγικής περιόδου, ενώ σε άτομα του winter flounder (*Pleuronectes americanus*, Walbaum 1792), το μεγαλύτερο ποσοστό κινητικότητας βρέθηκε στο ξεκίνημα της περιόδου παραγωγής σπέρματος. Επίσης, στο καλκάνι έχει παρατηρηθεί μείωση της κινητικότητας, της ικανότητας του για διατήρηση και γονιμοποίηση, όπως επίσης αλλαγή στην κυτταρική μεμβράνη του σπέρματος, όσο η αναπαραγωγική περίοδος εξελίσσεται. Όπως έχει επισημανθεί, στο λαυράκι και στο καλκάνι, ο γηρασμός των σπερματοζωαρίων μπορεί να έχει επίδραση και στην ικανότητα του για κατάψυξη (Suquet *et al.*, 2000). Ακόμη, η εποχή του χρόνου που το σπέρμα του γάδου (*Melanogrammus aeglefinus*, Linnaeus, 1758) και του μπακαλιάρου του Ατλαντικού (*Gadus morhua*, Linnaeus, 1758) συλλέχθηκε από τα αρσενικά, ήταν σημαντικός παράγοντας στον καθορισμό της επιτυχίας της κρυοδιατήρησης. Το σπέρμα που συλλέχθηκε αργά στην αναπαραγωγική περίοδο, παρουσίασε μειωμένη κινητικότητα μετά την απόψυξη, συγκρινόμενο με αυτό που συλλέχθηκε νωρίς από το ίδιο αρσενικό (Rideout *et al.*, 2004).

Η μειωμένη κινητικότητα και καταλληλότητα για κατάψυξη, η οποία σχετίζεται με το γηρασμό του σπέρματος, έχει ήδη αναφερθεί στην ιριδιζουσα πέστροφα και το λαβράκι. Στο τέλος της αναπαραγωγικής περιόδου αυτών των ειδών, η ικανότητα του σπέρματος να καταψυχθεί μειώνεται, το οποίο

μπορεί να προκαλείται από τα φαινόμενα του γηρασμού του σπέρματος (Oteme *et al.*, 1996).

5.2.5 Ασθένειες, θερμοκρασία εκτροφής των αρσενικών γεννητόρων και ορμονική πρόκληση παραγωγής σπέρματος

Ο κεστώδης *Ligula intestinalis* (L. 1758), ένα κοινό παράσιτο των κυπρινοειδών, μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή γαμετών, εμποδίζοντας την γοναδική ανάπτυξη. Ο ιός της μολυσματικής παγκρεατικής νέκρωσης (IPN), έχει αναφερθεί ότι προσκολλάται στα κύτταρα του σπέρματος της εκτρεφόμενης ιριδίζουσας πέστροφας και μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του σπέρματος, παρόλο που πειραματικά δεδομένα δεν είναι ακόμη διαθέσιμα (Rodriguez *et al.*, 1993).

Η θερμοκρασία εκτροφής των αρσενικών γεννητόρων επηρεάζει επίσης, την ποιότητα του σπέρματος. Στο στουργιόνι της Σιβηρίας, η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων είναι σημαντικά υψηλότερη στους 10°C (θερμοκρασία εκτροφής) και χαμηλότερη σε υψηλές θερμοκρασίες (17.5°C) (Rurangwa *et al.*, 2004).

Πολλά εκτρεφόμενα είδη, δεν παράγουν γεννητικό υλικό άμεσα σε αιχμαλωσία και η ορμονική παρέμβαση είναι πολλές φορές απαραίτητη, είτε για να προκληθεί η παραγωγή ωαρίων ή σπέρματος (Williot *et al.*, 2002), είτε για τον συγχρονισμό της απελευθέρωσης γαμετών των δύο φύλων, σε χρόνο εξυπηρετικό για την εκτροφή τους (Rurangwa *et al.*, 2004). Παρόλα αυτά, αυτή η πρακτική είναι γνωστό ότι αυξάνει την ρευστότητα του σπέρματος (χαμηλή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων) στον *Pleuronectes platessa*, Linnaeus, 1758) και στον ιππόγλωσο του Ατλαντικού (Vermeirssen *et al.*, 1998).

Η τεχνητή πρόκληση της παραγωγής σπέρματος, μπορεί επίσης να επηρεάσει την ανταπόκριση των αρσενικών ψαριών. Στο ευρωπαϊκό γατόψαρο (*Silurus glanis*, Linnaeus, 1758), ο ολικός αριθμός των σπερματοζωαρίων που συλλέγονται, είναι σημαντικά υψηλότερος, όταν διάλυμα υπόφυσης κυπρίνου εισάγεται με ένεση, σε σύγκριση με τη χρησιμοποίηση συνθετικού ανάλογου GnRHa (Linhart & Billard, 1994).

Αντίθετα, αυξημένος όγκος σπέρματος και επιμηκυμένη παραγωγή σπέρματος παρατηρήθηκε στο λαβράκι, όταν χορηγήθηκε GnRHα (*Rurangwa et al.*, 2004).

Ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της χορήγησης διάλυμα υπόφυσης και του χρόνου, κατά τον οποίο αυτή η διαδικασία αρχίζει να μειώνει την αρχική ποιότητα του σπέρματος, ποικίλει ανάλογα με το είδος (*Billard et al.*, 1995). Για παράδειγμα, στο στουργιόνι της Σιβηρίας, μια καθυστέρηση 36 ωρών, μετά την διέγερση και πριν τη συλλογή σπέρματος, παρέχει καθαρά τα πιο κινητικά σπερματοζώαρια, σε σύγκριση με μικρότερη (24 ώρες) ή μεγαλύτερη (48 ή 60 ώρες) καθυστέρηση (*Rurangwa et al.*, 2004).

5.3 Άμεσα αποτελέσματα στη γονιμοποίηση

5.3.1 Χρήση αναισθητικών και θερμοκρασία κατά την γονιμοποίηση

Ο τύπος και η συγκέντρωση του αναισθητικού που χρησιμοποιείται για να μειώσει το στρες, επηρεάζει την ποιότητα σπέρματος κατά τη διάρκεια των χειρισμών. Στην ιριδίζουσα πέστροφα, το ποσοστό του κινητικού σπέρματος δεν επηρεάστηκε από τη χρήση αναισθητικού, αλλά η διάρκεια της κινητικότητας του μειώθηκε, όταν η συγκέντρωση του αναισθητικού αυξήθηκε (*Rurangwa et al.*, 2004). Επιπρόσθετα, ο χρόνος της αναισθησίας, διαφοροποίησε σημαντικά τα χαρακτηριστικά της κινητικότητας του σπέρματος. Η επίδραση του χρόνου αναισθησίας, αποδείχθηκε με την μειωμένη διάρκεια της κινητικότητας του σπέρματος, μετά την έκθεση του ψαριού σε αναισθησία για 10 λεπτά (*Dietrich et al.*, 2005).

Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης, επηρεάζει, επίσης, την ποιότητα του σπέρματος των αρσενικών. Στα σπερματοζώαρια των σολομοειδών και των κυπρινοειδών η θερμοκρασία κατά τη γονιμοποίηση επηρεάζει την συχνότητα κίνησης της ουράς των (*Rurangwa et al.*, 2004). Στην ιριδίζουσα πέστροφα, η υψηλότερη θερμοκρασία, αυξάνει την συχνότητα του κτύπου και μειώνει τη διάρκεια της κίνησης (*Billard & Cosson*, 1992), ενώ όταν το ψάρι υποστεί χαμηλότερες θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια της

φυσικής ωτοκίας (4 – 10°C), η διάρκεια της κίνησης του σπέρματος αυξάνεται (Van Look, 2001). Στο Αφρικάνικο γατόψαρο, η χαμηλή θερμοκρασία (4° C), επίσης, επιμηκύνει την κινητικότητα και την βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων, σε σύγκριση με την θερμοκρασία εκτροφής (25° C) (Rurangwa *et al.*, 2004).

5.3.2 Επιμόλυνση με ούρα του σπέρματος

Έχει αποδειχθεί τα τελευταία χρόνια, ότι ακόμη και μικρό ποσοστό επιμόλυνσης με ουρία στο σπέρμα, επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα του (Glogowski *et al.*, 2000), ενώ είναι γνωστό ότι η εκτεταμένη μόλυνση με ούρα, μπορεί να επιφέρει μετατροπές στο περιβάλλον των σπερματοζωαρίων και να μειώσει την ικανότητα της κίνησης τους. Παρόλα αυτά, σε ορισμένα είδη ψαριών, η μόλυνση του σπέρματος από τα ούρα, κατά τη διάρκεια των χειρισμών για την συλλογή του σπέρματος είναι αναπόφευκτη, εξαιτίας της γειννίας του γεννητικού πόρου και της έδρας ή της παρουσίας ενός μόνο ουρογενετικού πόρου, διαμέσου του οποίου και το σπέρμα και τα ούρα εκκρίνονται (Rurangwa *et al.*, 2004). Για παράδειγμα, στο καλκάνι, ένα μέσο ποσοστό επιμόλυνσης της τάξης του 15.3% (όγκος ούρων : όγκος σπέρματος) έχει αναφερθεί (Suquet *et al.*, 2000).

Τεχνητή μόλυνση με ούρα ενός δείγματος σπέρματος, μείωσε το ποσοστό των κινούμενων σπερματοζωαρίων, την ταχύτητα τους, την ικανότητα γονιμοποίησης και την ικανότητα τους για διατήρηση. Αυτές οι επιπτώσεις επαυξάνονται, με την αύξηση της συγκέντρωσης των ούρων που αναμιγνύονται με το σπέρμα. Σε είδη με μεγάλη πυκνότητα σπέρματος, όπως το λαβράκι, η μόλυνση με ούρα είναι πιο εύκολα αναγνωρίσιμη, εξαιτίας της αλλαγής στο χρώμα του δείγματος σπέρματος που περιέχει ούρα (Suquet *et al.*, 2000). Επίσης, η επιμόλυνση του σπέρματος με ουρία, προκαλεί πρόβλημα στην αποθήκευση του σπέρματος, ακόμη και για μικρό χρονικό διάστημα (Rodina *et al.*, 2007).

Σε ορισμένα είδη ψαριών, τα ούρα προκαλούν την άμεση κίνηση του σπέρματος, όπως στο Ευρωπαϊκό γατόψαρο (Linhart & Billard, 1994), στον κοινό κυπρίνο και στο γλίνι (Perchec *et al.*, 1998). Επειδή αυτή η μόλυνση με

ούρα προκαλεί πρόωρη κινητικότητα, το σπέρμα μπορεί να γίνει μη κινητικό προτού η γονιμοποίηση συμβεί, (Rurangwa *et al.*, 2004). Στο μολυσμένο σπέρμα του κοινού κυπρίνου με ούρα, μειώνεται η ενδογενή αποθήκευση ενέργειας και η κινητικότητα (Perchec *et al.*, 1998). Στο σολομό του Ατλαντικού η μόλυνση με ούρα αυξάνει την μεταβλητότητα των συστατικών του σπερματικού πλάσματος και μειώνει την οσμωτική πίεση όπως και την συγκέντρωση του καλίου (Rana, 1995).

5.3.3 Ενεργοποίηση της κινητικότητας του σπέρματος

Το σπερματικό υγρό είναι πλούσιο σε θρεπτικά και ιόντα, μερικά εκ των οποίων είναι σημαντικά στο να διατηρούν την ποιότητα του σπέρματος, όταν αυτό αποθηκεύεται σε μη κινητική κατάσταση στους γεννητικούς αδένες. Οι παράγοντες του εξωτερικού περιβάλλοντος, μπορεί να επηρεάσουν την ποιότητα και την κινητικότητα του σπέρματος, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ενεργοποίησης. Επίσης, παράγοντες όπως το pH ή η παρουσία ιόντων, μπορεί να προκαλέσουν πόλωση στην μεμβράνη των κυττάρων και να διεγείρουν την κινητικότητα στα σπερματοζωάρια του σπέρματος (Rurangwa *et al.*, 2004). Στην ιριδιζουσα πέστροφα, η μείωση της κινητικότητας του σπέρματος, οφείλεται κυρίως στη συγκέντρωση των ιόντων K^+ (Billard & Cosson, 1992). Στο καλκάνι, οι αναερόβιες συνθήκες και τα υψηλά επίπεδα CO_2 μέσα στον αναπαραγωγικό αδένα, προκαλούν την αποτροπή της κινητικότητας του σπέρματος (Dreanno *et al.*, 1997).

Εργαστηριακές έρευνες, έδειξαν ότι το νερό δεν είναι το κατάλληλο μέσο ενεργοποίησης, παρόλο που τα σπερματοζωάρια των ψαριών φυσικά γονιμοποιούνται, είτε σε γλυκό, είτε σε θαλασσινό νερό (Rurangwa *et al.*, 2004). Η κινητικότητα του σπέρματος στη σπάτουλα είναι σημαντικά αυξημένη, με την ενεργοποίηση του από ένα ρυθμιστικό διάλυμα, αντί με απεσταγμένο νερό, καθώς ο χρόνος κινητικότητας επιμηκύνεται και υπάρχουν περιορισμένες βλάβες στα κύτταρα του σπέρματος. Κατά την ενεργοποίηση, τα κύτταρα του σπέρματος εκτίθενται σε «εχθρικό» περιβάλλον, για παράδειγμα σε υψηλή ή χαμηλή οσμωτική πίεση, σε σύγκριση με αυτή του σπερματικού υγρού. Για να αυξηθεί η βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων

κατά τη διάρκεια των χειρισμών, διάφορα διαλύματα αραίωσης σπέρματος ή διαλύματα ενεργοποίησης σπέρματος, χρησιμοποιούνται τα οποία είτε αντιγράφουν τη σύνθεση του σπέρματος, είτε έχουν την κατάλληλη σύνθεση, ώστε να αποκτούν ιδιότητες ενεργοποίησης. Για την ακριβή ποσοτική εκτίμηση της κινητικότητας, απαιτείται όλο το σπέρμα να ενεργοποιηθεί ταυτόχρονα (Rurangwa *et al.*, 2004). Για την πρόκληση της συγχρονισμένης κινητικότητας του 100% των σπερματοζωαρίων, απαιτείται πολύ μεγάλη αραίωση του σπέρματος, με τα διαλύματα ακινητοποίησης (1^η αραίωση) και ενεργοποίησης (2^η αραίωση) (Billard & Cosson, 1992).

Η ικανότητα γονιμοποίησης του κρυοδιατηρημένου σπέρματος, μειώνεται γρήγορα μετά την απόψυξη και η γονιμοποίηση πρέπει, επομένως, να πραγματοποιηθεί άμεσα (Kurocure *et al.*, 1984). Μια καθυστέρηση μεταξύ της απόψυξης και της ενεργοποίησης του σπέρματος του μπακαλιάρου, βρέθηκε ότι είναι επιβλαβής στην κινητικότητα μετά την απόψυξη. Μια καθυστέρηση 30 λεπτών, είχε ως αποτέλεσμα μια πολύ σημαντική μείωση στο δείκτη ανάκτησης της κινητικότητας (Rideout *et al.*, 2004). Οι Stoss & Holtz (1981), ανέφεραν τη μείωση της ικανότητας γονιμοποίησης του κρυοδιατηρημένου σπέρματος της ιριδίζουσας πέστροφας, με την αύξηση του χρόνου που μεσολαβεί από την απόψυξη, έως την γονιμοποίηση (Kurocure *et al.*, 1984).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

1. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΓΕΝΝΗΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Η αποθήκευση των γεννητικών προϊόντων, για μικρό ή μεγάλο χρονικό διάστημα, προέκυψε ως ανάγκη εξασφάλισης σπέρματος, κατά τη διάρκεια της τεχνητής αναπαραγωγής ή δημιουργίας ιδανικών υβριδίων μεταξύ των διάφορων ειδών (Πάσχος, 2004).

Επιπρόσθετα της παραγωγής ομόζυγων σειρών για βιοφαρμακευτικές και γονιδιακές έρευνες και μονοφυλετικών αποθεμάτων για εμπορικούς σκοπούς, η ανδρογένεση, είναι η βιοτεχνολογία που θεωρείται περισσότερο ελπιδοφόρα και αξιόπιστη, για την ανάκτηση ολοκληρωμένων πληροφοριών των γονιδίων του πυρήνα από διατηρημένα κύτταρα ψαριού. Αυτό συμβαίνει, διότι η διαδικασία της διατήρησης σπερματοζωαρίων, σε αντίθεση με την διαδικασία διατήρησης για ωκύτταρα ή ολόκληρα ωάρια, έχει αναπτυχθεί επιτυχώς. Η εφαρμογή της ανδρογένεσης σε προγράμματα τραπεζών γονιδίων, επιλαμβάνεται την ανάγκη και των υδατοκαλλιεργειών (διασφάλιση πολύτιμων στελεχών και σειρών) και της διατήρησης φυσικών αποθεμάτων (προστασία απειλούμενων με εξαφάνιση ειδών ή πληθυσμών) (Babiak *et al.*, 2001).

Ανάμεσα στις τεχνικές χειρισμού σπέρματος που έχουν καθιερωθεί σε μερικά είδη ψαριών η βραχυπρόθεσμη διατήρηση του σπέρματος με την ψύξη αυτού στους 4 - 6°C ή η μακράς διάρκειας διατήρηση με την κατάψυξη του σε υγρό άζωτο (-196°C) είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος και διευκολύνουν την τεχνητή αναπαραγωγή (Sucuet *et al.*, 2000). Αποθηκεύοντας μια "παρτίδα" αραιωμένου ή μη αραιωμένου σπέρματος σε ένα ψυγείο για ένα μικρό χρονικό διάστημα, είναι μια εύκολη διαδικασία, η οποία μπορεί να προσαρμοστεί σε οποιαδήποτε εκτροφή ψαριών. Η κρυοδιατήρηση σπέρματος, παρόλα αυτά, είναι μια τεχνική που απαιτεί περισσότερα βήματα, όπως σωστή επιλογή των διαλυμάτων αραιώσης και των κρυοπροστατευτικών ουσιών και ιδανικό ρυθμό κατάψυξης - απόψυξης (Maria *et al.*, 2006)

2. ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΣΕ ΨΥΚΤΙΚΟ ΘΑΛΑΜΟ **(ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ)**

Η μικρής διάρκειας αποθήκευση του σπέρματος ψαριού, η οποία μπορεί να ποικίλει από ώρες σε εβδομάδες, είναι μια τεχνική, αποδοτικά χρησιμοποιούμενη στα εκκολαπτήρια, για να αντιμετωπιστούν προβλήματα όπως του μη συγχρονισμού στην γεννητική ωριμότητα, της μεταφοράς γαμετών και / ή της επιλεκτικής χρήσης γεννητόρων (Koteeswaran & Pandian, 2002). Επίσης, η βραχυπρόθεσμη αποθήκευση του σπέρματος είναι επιθυμητή για την εκτίμηση της ποιότητας του σπέρματος και τον έλεγχο για ασθένειες πριν την κρυοδιατήρηση (Tiersch, 2001), ενώ, διευκολύνοντας την χρήση σπέρματος από ένα μεγαλύτερο αριθμό αρσενικών ανά θηλυκό, μπορεί να βοηθήσει στην βελτίωση της γενετικής ποικιλίας των απογόνων (Marques & Godinho, 2004). Μερικές ιχθυοκαλλιεργητικές τεχνικές, χρησιμοποιούν την αποθήκευση του σπέρματος σε κρύο δωμάτιο, για την γονιμοποίηση διαφορετικών "παρτίδων" ωαρίων (Rurangwa *et al.*, 2004).

Για μικρά χρονικά διαστήματα (έως 60 ώρες), το σπέρμα αποθηκεύεται σε γυάλινα δοχεία μεγάλης επιφάνειας, σε θερμοκρασία 5°C. Για χρονικό διάστημα περισσότερο από δύο εβδομάδες, τοποθετείται στο ψυγείο και σε στρώμα, όχι μεγαλύτερο των 0.5 cm, με συνεχή ανανέωση του αέρα που βρίσκεται εντός του δοχείου και πάνω από το στρώμα σπέρματος. Για διάστημα δε, περισσότερο από τρεις εβδομάδες, το σπέρμα μπορεί να αποθηκευτεί στο ψυγείο, σε αποστειρωμένο δοχείο, τοποθετώντας για κάθε 50 ml σπέρματος, 1ml αντιβιοτικού streptomycin. Το δοχείο γεμίζει με οξυγόνο, το οποίο ανανεώνουμε κάθε 3 – 4 ημέρες (Πάσχος, 2004).

Όταν το σπέρμα διατηρείται σε χαμηλές θερμοκρασίες (περίπου 4°C), τα σπερματοζωάρια έχουν χαμηλό μεταβολισμό και για αυτό το λόγο μπορούν να διατηρηθούν για μερικές ημέρες, σε κατάλληλα διαλύματα αραίωσης του σπέρματος, χωρίς σημαντικές αλλαγές στην ποιότητα τους. Παρόλα αυτά, η παρατεταμένη αποθήκευση σε κρύο δωμάτιο, μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ποιότητα του σπέρματος, επειδή οι αναερόβιες συνθήκες και η προκαλούμενη μικροβιακή μόλυνση, μπορεί να μειώσει την κινητικότητα και την βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων (Rurangwa *et al.*, 2004).

Το σπέρμα του Αμερικάνικου γατόψαρου (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque, 1818) σε συνθήκες διατήρησης (4°C) σε αποστειρωμένο διάλυμα, διατηρεί την κινητικότητα του μέχρι και μετά από 10 ημέρες διατήρησης. Αυτό το χρονικό διάστημα, συμπίπτει με τον χρόνο κατά τον οποίο αυξάνει η βακτηριακή μόλυνση, κυρίως του γένους *Pseudomonas* sp. Η βακτηριακή μόλυνση, φαίνεται ότι συμβάλλει στην μείωση της ποιότητας του σπέρματος, με την παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων και την κατανάλωση οξυγόνου. Σε μη αποστειρωμένο διάλυμα, η κινητικότητα σταματά εντελώς μετά από περίπου 3 ημέρες (Rurangwa *et al.*, 2004).

Η προσθήκη αντιβιοτικών σε κατάλληλη συγκέντρωση, μπορεί να επιμηκύνει τον χρόνο αποθήκευσης των κατεψυγμένων σπερματοζωαρίων, αποτρέποντας τη βακτηριακή μόλυνση στα κύτταρα του σπέρματος (Babiak *et al.*, 2001). Όμως, η υψηλή συγκέντρωση, μειώνει σημαντικά την βιωσιμότητα του σπέρματος και τη μιτοχονδριακή λειτουργία στην τιλάπια (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758), ενώ η προσθήκη οξυγόνου επιμηκύνει την επιβίωση των αποθηκευμένων κυττάρων σπέρματος (Rurangwa *et al.*, 2004).

Επίσης, το σπέρμα του Αμερικάνικου γατόψαρου που αποθηκεύτηκε σε πλαστικές σακούλες Zip-loc στους 4° C, με παροχή καθαρού οξυγόνου, διατήρησε την κινητικότητα του για σημαντικά μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (12 ημέρες), από ότι αυτό που αποθηκεύτηκε κατά τον ίδιο τρόπο χωρίς συμπληρωματικό οξυγόνο (7 ημέρες). Το σπέρμα που διατηρήθηκε με την προσθήκη κοκτέιλ αντιβιοτικών / αντιμυκητιακών ή μεθανόλης, διατήρησε την κινητικότητα του για σημαντικά μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (10 - 12 ημέρες), από ότι αυτό που αποθηκεύτηκε χωρίς πρόσθετα (6 – 8 ημέρες). Το σπέρμα που αποθηκεύτηκε σε διάλυμα αραίωσης, χωρίς γλυκόζη, παρέμεινε κινητικό για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (19 – 21 ημέρες), από ότι αυτό που αποθηκεύτηκε με γλυκόζη (13 – 16 ημέρες). Επίσης, η κινητικότητα διατηρήθηκε για περίπου 21 ημέρες, σε διάλυμα αραίωσης, με 5% μεθανόλη και χωρίς γλυκόζη. Σε κάθε περίπτωση, η απώλεια της κινητικότητας, συνοδεύτηκε από βακτηριακή αύξηση (Christensen & Tiersch, 1996).

3. ΚΡΥΟΔΙΑΤΗΡΗΣΗ

3.1 Εισαγωγή

Η επιστήμη της κρυοδιατήρησης, σχετίζεται με την μακράς διάρκειας αποθήκευση βιολογικού υλικού σε μια κατεψυγμένη, αλλά βιώσιμη κατάσταση, σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (Rana, 1995).

Καθώς η θερμοκρασία των κυττάρων μειώνεται, η μοριακή κίνηση περιορίζεται, ενώ σε θερμοκρασίες κάτω από τους -130°C , όλη η μοριακή κυτταρική κίνηση διακόπτεται. Αυτή η κατάπαυση της κυτταρικής δραστηριότητας στα κατεψυγμένα κύτταρα, διαμορφώνει τη βάση για την διατήρηση του κρυοδιατηρημένου υλικού, για απροσδιόριστο χρονικό διάστημα. Το βιολογικό υλικό μπορεί να αποθηκευτεί επιτυχώς στους -150°C , αλλά για πρακτικούς λόγους τα δείγματα, συνήθως, αποθηκεύονται στους -196°C , τη θερμοκρασία του υγρού αζώτου (Rana, 1995).

Η κρυοδιατήρηση προήλθε ως τεχνική, για την κατάψυξη αρσενικών ανθρώπινων γαμετών ή σπέρματος. Παρόλο που έχει πειραματιστεί από τα τέλη του 17^{ου} αιώνα, δεν ήταν παρά πριν 50 χρόνια, όταν το ανθρώπινο σπέρμα έγινε ικανό να καταψυχθεί και αργότερα να αποψυχθεί κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να έχει έπειτα την ικανότητα να γονιμοποιήσει και να προκαλέσει την ανάπτυξη. Τις τελευταίες δεκαετίες, η τεχνολογία της κρυοδιατήρησης ή της διατήρησης σε μια ζωντανή κατάσταση, έχει προοδεύσει σημαντικά. Με τη χρήση σύγχρονων τεχνικών, η κρυοδιατήρηση του σπέρματος βελτιώνεται, έτσι ώστε να παραμένει η ικανότητα ενός ατόμου να αναπαράγει και αυτή η τεχνική να είναι επιτυχής, ασφαλής και ευρέως διαθέσιμη (Carrell, 2000).

Η κρυοπροστασία του σπέρματος των αντρών, χρησιμοποιείται σήμερα σε διάφορες περιπτώσεις, που περιλαμβάνουν την τεχνητή αναπαραγωγή, θεραπείες ακτινοβολήσης ή χημειοθεραπεία, σαν “ασφάλεια γονιμοποίησης” για άντρες που υπόκεινται βασεκτομή και για την αποθήκευση σπέρματος δωρητών, μέχρι να επιβεβαιωθεί η μη ύπαρξη HIV ή ηπατίτιδας. Η κρυοαποθήκευση σπέρματος, εξασφαλίζει ότι είναι διαθέσιμο για πολλαπλές θεραπείες ενδοκυτοπλασματικής έγχυσης σπέρματος (Intra Cytoplasmic Sperm Injection, ICSI), από μια απλή βιοψία (O’Connel *et al.*, 2002).

Η βασικότερη ίσως μέθοδος, για τη διατήρηση των γενετικών χαρακτηριστικών, κάθε είδους ψαριού, είναι (εκτός από τα μέτρα προστασίας του στο φυσικό του περιβάλλον) η διατήρηση του γεννητικού του υλικού σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης (Πάσχος, 2004).

Για την εξέλιξη της διατήρησης του σπέρματος ζώων, το κρίσιμο βήμα έγινε όταν οι Polge *et al.* (1949), χρησιμοποίησαν γλυκερίνη για να προστατεύσουν τα σπερματοζωάρια ταύρου, από τις επιβλαβείς συνέπειες της κατάψυξης και της απόψυξης. Η γλυκερόλη ενεργεί διπλά, και στο να αποτρέπει τον σχηματισμό μεγάλων κρυστάλλων πάγου, αλλά και για να επιβραδύνει την εκτεταμένη αύξηση της συγκέντρωσης αλάτων στα κύτταρα (Moczarski & Koldras, 1982).

Οι περισσότερες από τις μελέτες κρυοδιατήρησης σπέρματος επικεντρώθηκαν αρχικά στα είδη γλυκού νερού όπως τα κυπρινοειδή, τα σολομοειδή και τα γατόψαρα. Τα τελευταία χρόνια, με την ταχεία ανάπτυξη της ιχθυοκαλλιέργειας θαλασσινών ειδών, μερικά πειράματα κρυοδιατήρησης έχουν επίσης διεξαχθεί σε είδη θαλασσινών ψαριών και ειδικότερα ψαριών υψηλής εμπορικής αξίας. Παρόλο που επιτυχή κρυοδιατήρηση σπέρματος έχει γίνει σε ορισμένα είδη, καμία τεχνική δεν έχει αναπτυχθεί για την κρυοδιατήρηση σπέρματος όλων των ειδών ψαριών (Liu *et al.*, 2006). Επίσης, παρά τις σημαντικές εξελίξεις που έχουν επιτευχθεί στην κρυοδιατήρηση, υπάρχουν ακόμη διαφορές στην επιτυχία της (Kerby, 1983), οι οποίες κυρίως πρέπει να αποδίδονται στις εποχιακές διακυμάνσεις, στην ποικιλία της ποιότητας του σπέρματος, στην τεχνική συλλογής, στο διάλυμα αραίωσης, στο ακριβές καθεστώς κατάψυξης – απόψυξης, στις συνθήκες διατήρησης και στις τεχνικές γονιμοποίησης μετά την απόψυξη (Rana, 1995).

Οι γενετικές πληροφορίες που αντιπροσωπεύονται από ένα είδος, θα μπορούσαν να αποθηκευτούν, με την διατήρηση ζωντανών ψαριών σε τράπεζα γονιδίων. Τέτοιες τράπεζες, παρόλα αυτά, έχουν δύο κύρια μειονεκτήματα. Πρώτον, δεν παρέχουν μεγάλης διάρκειας εγγύηση της γενετικής σταθερότητας του πληθυσμού ή των ειδών, με το πέρασμα του χρόνου και έτσι τα αποθέματα του εκκολαπτηρίου, δεν μπορούν να διατηρηθούν στην αρχική τους κατάσταση. Δεύτερον, δεδομένου της φυσικής γενετικής ποικιλίας, θα είναι απαγορευτικά πολυέξοδο, να διατηρηθούν οι επιθυμητές αντιπροσωπευτικές γενετικές πληροφορίες ενός πληθυσμού ή

είδους, σε μια ζωντανή τράπεζα γονιδίων. Για να ξεπεραστούν αυτά τα ελλείμματα, οι γενετικές πληροφορίες μπορούν να διατηρηθούν με τη μορφή παγωμένων γαμετών ή εμβρύων. Οι κρυοτράπεζες μπορούν να παίξουν ένα κρίσιμο ρόλο στους γενετικούς χειρισμούς και τη διατήρηση υδάτινων αποθεμάτων (Barbato *et al.*, 2005).

Η κρυοδιατήρηση περιλαμβάνει διάφορες βασικές δραστηριότητες, οι οποίες περιλαμβάνουν συνοπτικά, την συλλογή του σπέρματος, την αραίωση του, την αποθήκευση του σε ψυκτικό θάλαμο, την κατάψυξη, την κρυοδιατήρηση, την απόψυξη, την γονιμοποίηση και την εκτίμηση του αποψυγμένου σπέρματος. Κάθε δραστηριότητα είναι σημαντική και η αποτυχία σε οποιοδήποτε από αυτά τα βήματα, μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχία ολόκληρης της διαδικασίας (Tiersch, 2001).

Παρόλο που όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η μέθοδος κρυοδιατήρησης του σπέρματος έχει αναπτυχθεί για πολλά είδη ψαριών, η κρυοδιατήρηση ωοθηκών και εμβρύων δεν είναι ακόμη επιτυχής (Bart, 2000), έστω και αν υπάρχουν αναφορές ότι απομονωμένα βλαστομερίδια μπορούν να καταψυχθούν (Babiak *et al.*, 2002). Στην προσπάθεια κρυοδιατήρησης των ωαρίων και των εμβρύων, φαίνεται ότι υπάρχουν δύο κύρια εμπόδια. Αρχικά, η χαμηλή περατότητα της μεμβράνης, καθιστά την απομάκρυνση του νερού από το υλικό και την διείσδυση του κρυοπροστατευτικού παράγοντα δύσκολη, ενώ τα υψηλά περιεχόμενα λεκίθου της ωοθήκης και των νεαρών εμβρύων, αποτελούν ένα φυσικό εμπόδιο και επομένως, είναι δύσκολο να αποφευχθούν οι αρνητικές συνέπειες της ύπαρξης νερού στο εσωτερικό των κυττάρων. Και τα δύο αυτά χαρακτηριστικά, έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μεγάλων σχηματισμών κρυστάλλων πάγου, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κατάψυξης. Επιπλέον, οι ωοθήκες και τα έμβρυα, είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στην κρυοζημιά (Rawson & Zhang, 2005).

Προσπάθειες κρυοδιατήρησης, με φτωχά όμως αποτελέσματα, έγιναν και για είδη rotifers, και πιο συγκεκριμένα για το *Brachionus plicatilis* (Muller 1786) (Toledo & Kurokura, 1990).

Καθορίζοντας την ιδανική διαδικασία για την κρυοδιατήρηση του σπέρματος ενός συγκεκριμένου είδους, δεν είναι μια απλή μέθοδος (Guest *et al.*, 1976). Υπάρχουν πολυάριθμοι παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν την

επιτυχία της διαδικασίας κρυοδιατήρησης, συμπεριλαμβάνοντας την διαλυτική ουσία, τα κρυοπροστατευτικά, τον χρόνο εξισορρόπησης, το ποσοστό αραίωσης, το ρυθμό κατάψυξης, το ρυθμό απόψυξης, τον χρόνο μεταξύ της απόψυξης και της ενεργοποίησης, καθώς και τον χρόνο συλλογής του σπέρματος (Rideout *et al.*, 2004).

Η πρόκληση στην εξέλιξη της κρυοδιατήρησης, είναι η επιτυχία της εφαρμογής της στα εκκολαπτήρια. Μέχρι σήμερα, και παρά την επιτυχή κρυοδιατήρηση σε συνθήκες εργαστηρίου, υπάρχουν λίγα παραδείγματα εφαρμογής σε συνθήκες εκκολαπτηρίου, διότι ορισμένα προβλήματα παραμένουν ακόμη άλυτα (Chen *et al.*, 2004), με βασικότερο αυτό της δυνατότητας αποθήκευσης, μόνο, μικρού όγκου σπέρματος (Tiersch, 2001) .

Το κρυοδιατηρημένο σπέρμα, παραδοσιακά αποθηκεύεται σε “καλαμάκια” 0,25 και 0,5 ml (Liu *et al.*, 2006), ενώ στο σπέρμα των σολομοειδών, έχει αναφερθεί, ότι χρησιμοποιούνται επιτυχώς, μεγαλύτερου όγκου “καλαμάκια” (5 και 10 ml). Έτσι, τα μικρού όγκου “καλαμάκια”, περιορίζουν την ευρεία χρήση αυτής της τεχνικής στα περισσότερα εκκολαπτήρια (Chen *et al.*, 2003). Επίσης, δεν υπάρχουν αναφορές των οικονομικών απαιτήσεων, για τη χρησιμοποίηση αυτής της τεχνολογίας στα υδρόβια είδη και, επομένως, είναι αναγκαίο να γίνει μια γενική ανάλυση των επενδύσεων και του κόστους λειτουργίας, που απαιτούνται για ένα ολοκληρωμένο σύστημα κρυοδιατήρησης, σε ένα εν λειτουργία εκκολαπτήριο (Caffey & Tiersch, 2000).

3.2 Πλεονεκτήματα χρήσης κρυοδιατηρημένου σπέρματος

Η κρυοδιατήρηση του σπέρματος, μπορεί να αποδειχθεί πολύ ωφέλιμη για τις υδατοκαλλιέργειες (Sunarma *et al.*, 2007) καθώς η ανάπτυξη αυτών αυξάνει την ανάγκη για επιλογή των γεννητόρων (Richardson *et al.*, 2000). Ο έλεγχος της τεχνητής αναπαραγωγής στα ψάρια, απαιτεί γαμέτες υψηλής ποιότητας και, συχνά, την αποθήκευσή τους, για μερικές ώρες, ημέρες ή χρόνια (Chereguini *et al.*, 1997).

Αρχικά, η κρυοδιατήρηση σπέρματος ψαριών θα μπορούσε να είναι πολύ μεγάλης σημασίας στην εκτροφή ψαριών, διότι θα ήταν δυνατό να

επιτρέψει την ίδρυση τραπεζών γονιδίων (Ogier de Baulny *et al.*, 1997). Η τράπεζα γονιδίων, άλλωστε, είναι ένα αναπόσπαστο κομμάτι, των γενετικών προγραμμάτων διατήρησης (Babiak *et al.*, 2002b) και μπορεί να επιτευχθεί με σχετικά χαμηλό κόστος (Bart, 2000).

Η χρήση κρυοδιατηρημένων σπερματοζωαρίων, μπορεί να καθυστερήσει από την ημερομηνία της συλλογής του και να προσαρμοστεί στη στιγμή της συλλογής των ωαρίων (Suquet *et al.*, 2000). Αυτό είναι χρήσιμο, γιατί, συνήθως, οι αρσενικοί γεννήτορες ωριμάζουν, ηλικιακά, νωρίτερα των θηλυκών και πάντα, σε συντριπτικά μεγαλύτερο ποσοστό, στην αρχή της περιόδου αναπαραγωγής, αντιπροσωπεύοντας, σχεδόν, το σύνολο των γενετικών χαρακτηριστικών. Σταδιακά η παρουσία των ώριμων αρσενικών μειώνεται και όπως είναι φυσικό και οι πιθανότητες έκφρασης όλων των γενετικών χαρακτηριστικών (Πάσχος, 2004). Έτσι, μπορεί να επιτευχθεί συγχρονισμός της διαθεσιμότητας γαμετών, και των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων (De Graaf *et al.*, 2004), επειδή το σπέρμα μπορεί να είναι διαθέσιμο σε όλη τη διάρκεια του αναπαραγωγικού κύκλου (Lahnsteiner *et al.*, 1998).

Επιπλέον, είναι δυνατή η χρήση, του ολικού όγκου του διαθέσιμου σπέρματος. Αυτό είναι χρήσιμο για την οικονομία του σπέρματος, σε είδη όπου αυτό είναι δύσκολο να ληφθεί, όπως στο γιαπωνέζικο χέλι (*Anguilla Japonica*, Temmick & Schlegel, 1846), αλλά και σε είδη όπου μόνο μικρή ποσότητα σπέρματος μπορεί να ληφθεί, όταν αυτά βρίσκονται σε αιχμαλωσία (Suquet *et al.*, 2000).

Η διατήρηση σπέρματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα εκκολαπτήρια, ώστε να επιτρέψει τις γενετικές βελτιώσεις, ελαχιστοποιώντας το κόστος διατήρησης γεννητόρων και μειώνοντας το ρίσκο διάδοσης ασθενειών (Richardson *et al.*, 1999), ενώ επιτρέπει την μακροπρόθεσμη αποθήκευση του σπέρματος για χρήση, όταν η ποιότητα μειώνεται (Lubzens *et al.*, 1997). Ακόμη, με τη χρήση κρυοδιατηρημένου σπέρματος, επιτυγχάνεται απλοποίηση της διατήρησης γεννητόρων. Στα περισσότερα εκτρεφόμενα είδη, μπορεί να προκληθεί εκτός εποχής γονιμοποίηση, με χειρισμό της φωτοπεριόδου και του κύκλου της θερμοκρασίας. Παρόλα αυτά, η τεχνική έχει υψηλό κόστος. Όταν όμως, κρυοδιατηρημένο σπέρμα είναι διαθέσιμο σε όλη τη διάρκεια του χρόνου, ο χειρισμός της εποχής γονιμοποίησης, μπορεί να

περιοριστεί στα θηλυκά (Bromage, 1995). Επίσης, σπάνιο γενετικό υλικό, μπορεί να διατηρηθεί και να μεταφερθεί, με έναν οικονομικό τρόπο (Altunok *et al.*, 2004). Η μεταφορά των γαμετών αποδεικνύεται ιδιαίτερα χρήσιμη, όταν οι θηλυκοί και αρσενικοί γαμέτες συλλέγονται σε διαφορετικές τοποθεσίες. Αυτό καθιστά ικανή την εισαγωγή γονιδίων από "άγρια", σε αποθέματα εκκολαπτηρίου (Sucuet *et al.*, 2000).

Η προκαλούμενη ανδρογένεση, με τη χρήση κρυοδιατηρημένων σπερματοζωαρίων, θεωρείται σαν ο πιο αξιόπιστος τρόπος, για να ανακτήσουμε γονιδιακές πληροφορίες του πυρήνα των ψαριών (Babiak *et al.*, 2002b). Η χρήση τράπεζας γονιδίων, επιτρέπει τη διατήρηση γονιδίων από επιλεγμένα αρσενικά ή αποθέματα, τα οποία έχουν επιθυμητά χαρακτηριστικά, όπως για παράδειγμα, σε περίπτωση προγραμμάτων επιλογής (Rana, 1995).

Ακόμη, αποφεύγεται η ωρίμανση του σπέρματος. Ο γηρασμός του σπέρματος κατά τη διάρκεια της περιόδου αναπαραγωγής, έχει αναφερθεί για πολλά είδη ψαριών και το αποτέλεσμα είναι η μείωση της ποιότητας του σπέρματος (Rana, 1995). Η κρυοδιατήρηση επιτρέπει τη συλλογή του, όταν αυτό έχει την μέγιστη ποιότητα (Sucuet *et al.*, 2000).

Η χρήση κρυοδιατηρημένου σπέρματος, δίνει τη δυνατότητα χρησιμοποίησης σπέρματος σε πειραματικά προγράμματα. Για παράδειγμα, σε γενετικές έρευνες, στη σύγκριση της «απόδοσης» της αναπαραγωγής από διαδοχικές γενιές στο ίδιο πείραμα και για πειράματα, όπου η χρήση άριστων δειγμάτων σπέρματος είναι αναγκαία για μια παρατεταμένη περίοδο, όπως στην μελέτη για τη βραχυπρόθεσμη αποθήκευση ωαρίων (Sucuet *et al.*, 2000).

Τράπεζα γονιδίων κρυοδιατηρημένου σπέρματος, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί, για να διατηρήσουμε τη γενετική ποικιλότητα πληθυσμών ψαριών (Melo & Godinho, 2006), τα οποία κινδυνεύουν με εξαφάνιση και για προστασία εναντία στην ομομιξία (Sucuet *et al.*, 2000). Σε πρωτόγυνα ερμαφρόδιτα είδη, όπως το black grouper (*Epinephelus malabaricus*, Bloch & Schneider, 1801), το σπέρμα μπορεί να συλλεχθεί σε ψάρια ηλικίας 5 ή και 10 ετών. Σαν συνέπεια η επιτυχία στην αναπαραγωγή βελτιώνεται σημαντικά, με τη χρήση κρυοδιατηρημένου σπέρματος (Sucuet *et al.*, 2000).

Επιπρόσθετα, η δημιουργία τράπεζας σπέρματος, συνεισφέρει στην προστασία από εκδήλωση ασθενειών και διατήρηση του “disease free” status, στο τμήμα γεννητόρων του εκκολαπτηρίου (Πάσχος, 2004). Κατά τη διάρκεια του ξεσπάσματος μιας ασθένειας, ολόκληρα αποθέματα μπορούν να επηρεαστούν. Έτσι, η περιοδική κατάψυξη σπέρματος από αρσενικά, ελεύθερα ασθενειών, μπορεί να βοηθήσει, ώστε να αποτραπεί μια τέτοια καταστροφή των εκκολαπτηρίων (Rana, 1995).

Η κρυοδιατήρηση σπερματοζωαρίων που συλλέχθηκαν από νεκρά ψάρια, μπορεί να αποδειχθεί λειτουργική στην διατήρηση ειδών και στην επαναφορά τους, με την παραγωγή ενός απειλούμενου με εξαφάνιση είδους (με τη χρήση ωαρίων ενός συγγενικού είδους), ή ανδρογενετικού πληθυσμού, κατά τη διάρκεια καταστροφής (Routray *et al.*, 2006).

Τέλος, μπορεί να προστατευτεί η γενετική ποικιλότητα, σε πληθυσμό εκκολαπτηρίου (Gwo, 1993). Η γενετική ποιότητα και ποικιλία των απογόνων, είναι ένα σημαντικό θέμα στα προγράμματα αποθήκευσης ψαριών, όταν χρησιμοποιείται ένας μικρός αριθμός γεννητόρων στην διαδικασία. Έτσι μια τράπεζα γονιδίων θα ήταν ένα κατάλληλο εργαλείο για την διασφάλιση της γενετικής ποικιλότητας σε προγράμματα επιλογής γεννητόρων (Melo & Godinho, 2006).

3.3 Ρυθμός κατάψυξης – απόψυξης και τεχνικές γονιμοποίησης

3.3.1 Ρυθμός κατάψυξης

Ο ρυθμός κατάψυξης και ο ρυθμός απόψυξης, θεωρούνται σαν οι πιο κρίσιμες φάσεις της κρυοδιατήρησης (Franks, 1985).

Η ιδανική μέθοδος και ο κατάλληλος ρυθμός κατάψυξης, εξαρτάται από πολλούς, μερικές φορές αντικρουόμενους, παράγοντες. Οι ιδανικές συνθήκες κατάψυξης, συχνά καθορίζονται δοκιμαστικά και το λάθος, που καταλήγει σε αποτυχία του πρωτοκόλλου, καθορίζει τον ρυθμό κατάψυξης, εάν και κατά πόσο η θερμοκρασία πρέπει να μειωθεί στα διάφορα βήματα, ποιο κρυοπροστατευτικό θα χρησιμοποιηθεί κτλ. Σκοπός είναι να αποτραπεί

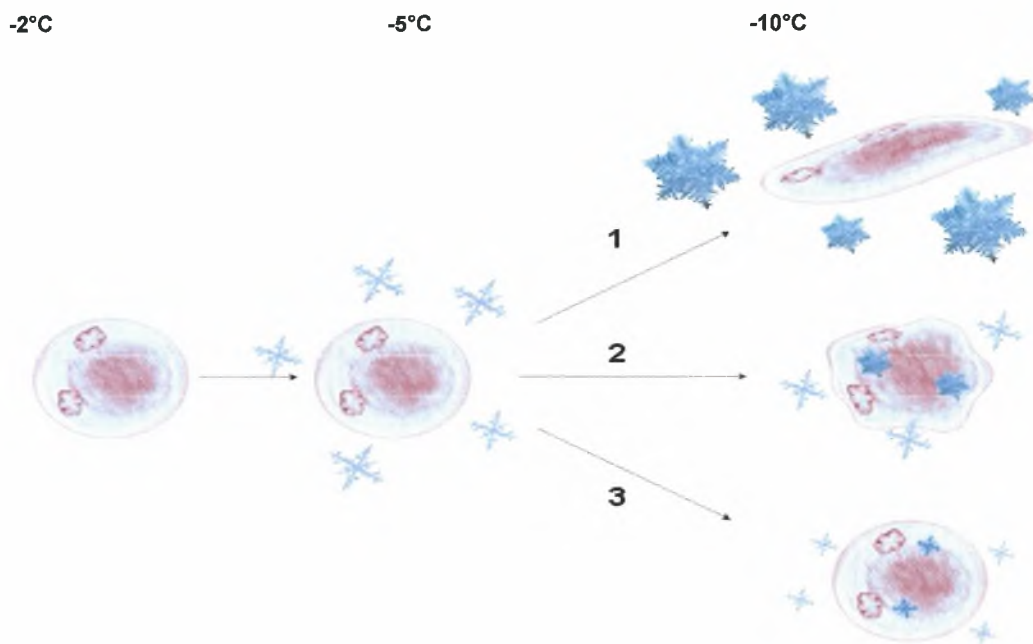
το θερμικό σοκ, το επιβλαβές αποτέλεσμα της υπερβολικής συγκέντρωσης αλάτων και η ζημιά στο κολλοειδές περιβάλλον του κυττάρου (Rana, 1995).

Κατά τη διάρκεια της κατάψυξης, η κρυσταλλοποίηση πάντοτε αρχίζει στο εξωκυτταρικό “διαμέρισμα” του κυττάρου. Αυτό σημαίνει, ότι η οσμωτική ισορροπία του κυττάρου διαταράσσεται και καταλήγει στην αφυδάτωση του. Η αυξανόμενη συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών που προκύπτει, μπορεί να οδηγήσει σε μη αναστρέψιμη ζημιά (Sucuet *et al.*, 2000).

Όταν ο πάγος αρχίζει να σχηματίζεται, ένας σημαντικός παράγοντας, αναφορικά με την διατήρηση της βιωσιμότητας του κυττάρου κατά τη διάρκεια της επακόλουθης κατάψυξης, είναι ο ρυθμός αλλαγής της θερμοκρασίας. Αυτός καθορίζει την διάρκεια του χρόνου που τα κύτταρα διάγουν πάνω από το ευτηκτικό σημείο, τη διάρκεια του χρόνου που αυτά εκτίθενται σε υψηλή συγκέντρωση αλάτων, το ρυθμό ενδοκυτταρικής κατάψυξης και το μέγεθος και το σχήμα οποιουδήποτε κρυστάλλου πάγου σχηματιστεί (Rana, 1995).

Εάν η κατάψυξη είναι αργή, ο σχηματισμός κρυστάλλων αυξάνεται στο εξωκυτταρικό διαμέρισμα και έτσι προκαλείται η σύμπτυξη των κυττάρων και η έκθεση τους σε πολύ υψηλή συγκέντρωση αλάτων. Επακόλουθα, η υγρή φάση καταψύχεται στην θερμοκρασία τήξης. Εάν η κατάψυξη είναι ταχεία, το νερό στο εσωτερικό των κυττάρων, σχηματίζει μικρούς, ακανόνιστου σχήματος, κρυστάλλους πάγου, οι οποίοι είναι σχετικά ασταθείς. Επειδή και η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας και ο σχηματισμός ενδοκυτταρικού πάγου, συμβάλουν στην βλάβη του κυττάρου, ένας ιδεατός ρυθμός κατάψυξης δεν πρέπει να είναι ούτε πολύ αργός, ούτε πολύ γρήγορος (Li *et al.*, 2006).

Εάν τα κύτταρα στη συνέχεια αποψυχθούν πολύ αργά, αυτοί οι κρύσταλλοι θα συγκεντρωθούν για να σχηματίσουν μεγαλύτερους, πιο σταθερούς κρυστάλλους, οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν ζημιά (Εικόνα 2) (Li *et al.*, 2006).



1 : αργή κατάψυξη

2 : γρήγορη κατάψυξη

3 : πολύ γρήγορη κατάψυξη

Εικ. 2 Ρυθμός κατάψυξης και σχηματισμός ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών κρυστάλλων πάγου ([www. Cryobiosystem-imv.com](http://www.Cryobiosystem-imv.com)).

Η αύξηση στη συγκέντρωση των αλάτων, η οποία συνοδεύει την διαδικασία κατάψυξης, προκαλεί συρρίκνωση των κυττάρων, η οποία εάν συνεχιστεί πέρα από ένα συγκεκριμένο όριο, οδηγεί σε περατότητα της μεμβράνης στα ιόντα (Bromage, 1995). Το κύτταρο αφυδατώνεται, καθώς η κατάψυξη προχωράει εξωκυτταρικά, με τον ρυθμό και την έκταση αυτής της διαδικασίας, να εξαρτώνται από τον ρυθμό της κατάψυξης και την περατότητα των κυττάρων. Εάν η προκαλούμενη αφυδάτωση είναι τόσο δριμεία, μπορεί να προκληθεί τοξικότητα ή βλάβη, εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης των ηλεκτρολυτών. Αυτή η κατάσταση συλλήβδην ονομάζεται «επίδραση διαλύματος», η οποία τελικά, προκαλεί βλάβη στο σπέρμα. Η υψηλή συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών, επηρεάζει της ιοντικές αλληλεπιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων αυτών που βοηθούν στη σταθεροποίηση της ενδημικής κατάστασης των ενζύμων (Li *et al.*, 2006).

Η επιβίωση των κυττάρων, επομένως, εξαρτάται από τον ρυθμό κατάψυξης. Η κατάψυξη κορυφώνεται σε ένα συγκεκριμένο ρυθμό και στη συνέχεια μειώνεται, καθώς ο ρυθμός αυξάνεται επιπλέον. Ο ιδανικός ρυθμός είναι αρκετά αργός, ώστε να επιτρέπει στα κύτταρα να χάσουν επαρκή

ποσότητα νερού για να αποτραπεί η πρόωρη ενδοκυτταρική κατάψυξη. Παρόλα αυτά, εάν ο ρυθμός είναι υπερβολικά αργός, τα κύτταρα εκτίθενται σε υψηλή συγκέντρωση αλάτων, για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ο κύριος παράγοντας που προκαλεί απώλεια βιωσιμότητας, είναι ο σχηματισμός ενδοκυτταρικών κρυστάλλων πάγου, και ειδικότερα η συγκέντρωση αυτών των κρυστάλλων κατά τη διάρκεια της απόψυξης (Rana, 1995).

Για την κατάψυξη του σπέρματος ψαριών, γενικά, μια διαδικασία δύο βημάτων χρησιμοποιείται. Το σπέρμα αρχικά ψύχεται σε ατμούς του αζώτου, σε ένα πλωτό δίσκο ή στο “λαιμό” του δοχείου, και έπειτα τα “καλαμάκια” βυθίζονται στο υγρό άζωτο. Ο ρυθμός κατάψυξης, εξαρτάται από το ύψος του δίσκου ή το βάθος, στο οποίο το κουτί θα τοποθετηθεί (Suquet *et al.*, 2000). Αυτή η διαδικασία, παρόλο που χρησιμοποιείται ευρέως, δεν είναι η πιο ενδεδειγμένη, γιατί ο ρυθμός κατάψυξης είναι ευμετάβλητος και είναι δύσκολο να προβλεφθεί επακριβώς (Rana, 1995).

Η κινητικότητα των κατεψυγμένων σπερματοζωαρίων του *barramundi* (*Lates calcarifer*, Bloch, 1790), δεν επηρεάζεται από το ρυθμό κατάψυξης, μεταξύ 1 και 30°C ανά λεπτό, καταδεικνύοντας την μεγάλη αντοχή του στην κατάψυξη. Από την άλλη, μια χαμηλότερη ανθεκτικότητα στην κατάψυξη αναφέρθηκε στο λαβράκι, καθώς ο ρυθμός κατάψυξης ήταν ιδανικός, μόνο στους 10°C ανά λεπτό, σε σύγκριση με 1, 5, 20, 50 και 100°C ανά λεπτό. Συνεπώς, ο ιδανικός ρυθμός κατάψυξης σχετίζεται άμεσα με το είδος του ψαριού (Suquet *et al.*, 2000) .

3.3.2 Ρυθμός απόψυξης

Υπάρχει γενικά μια έλλειψη διαθέσιμων δεδομένων, όσον αφορά τις συνθήκες απόψυξης. Η απόψυξη συνήθως γίνεται με την τοποθέτηση των “καλαμακιών” σε υδατόλουτρο, με τη θερμοκρασία να ρυθμίζεται με έναν θερμοστάτη, ενώ αμέσως μετά την απόψυξη τα “καλαμάκια” απομακρύνονται και το σπέρμα διαχέεται πάνω στα ωάρια (Lahnsteiner, 2000).

Ο ρυθμός απόψυξης, είναι στενά συνδεδεμένος με το ρυθμό κατάψυξης. Παρόλο που ο ρυθμός απόψυξης δεν έχει τόσο σημαντικά αποτελέσματα στα κύτταρα που καταψύχονται αργά, έχει μείζων επίδραση

στα κύτταρα που καταψύχονται πολύ γρήγορα (Rana, 1995). Σημαντική ζημιά στο σπέρμα, μπορεί να προκληθεί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας απόψυξης, καθώς ο πάγος λιώνει ή αποκρυσταλλώνεται. Η αργή απόψυξη είναι πολύ πιθανό να προκαλέσει βλάβη, καθώς παρέχει τον χρόνο για την ενοποίηση των μικροσκοπικών παγοκρυστάλλων, σε μεγάλους σχηματισμούς. Η επιβίωση του σπέρματος, επίσης, εξαρτάται από την σύνθεση των διαλυμάτων αραίωσης, την οσμωτική πίεση και άλλους παράγοντες κατά τη διάρκεια της κατάψυξης και της απόψυξης (Li *et al.*, 2006).

Η ταχεία απόψυξη είναι απαραίτητη, για να αποτραπεί η επανακρυσταλλοποίηση. Ο βαθμός απόψυξης που χρησιμοποιείται σε θαλασσινά ψάρια, είναι μικρότερος απ' αυτόν που αναφέρεται για τα ψάρια εσωτερικών υδάτων. Στο καλκάνι, η θερμοκρασία απόψυξης μεταξύ 20 και 40°C δεν επηρεάζει την κινητικότητα του σπέρματος, μετά την απόψυξη. Αντίθετα, μια αύξηση στην θερμοκρασία απόψυξης από τον 1, στους 30 °C, μείωσε την κινητικότητα μετά την απόψυξη των σπερματοζωαρίων του Ωκεανικού γατόψαρου. Όταν τα σπερματοζωάρια του Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*, Linnaeus, 1766), αποψύχθηκαν στους 0 °C, το ποσοστό γονιμοποίησης ήταν σημαντικά πιο χαμηλό από ότι στους 25 και στους 50 °C (Suquet *et al.*, 2000).

Η απόψυξη είναι η πιο ευαίσθητη παράμετρος, κατά τη διάρκεια της κρυοδιατήρησης, για το σπέρμα των σολομοειδών και μικρές αποκλίσεις από τις ιδανικές συνθήκες, είναι ικανές να μειώσουν σημαντικά την επιτυχία της γονιμοποίησης. Όταν ο χρόνος που διαρκεί η απόψυξη αλλάζει μόνο για 5 sec ή η θερμοκρασία απόψυξης για 5°C, η ικανότητα γονιμοποίησης του αποψυγμένου σπέρματος μειώνεται σημαντικά (Lahnsteiner, 2000).

3.3.3 Τεχνικές γονιμοποίησης κατεψυγμένου – αποψυγμένου σπέρματος

Οι ζημιές που προκαλούνται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κατάψυξης – απόψυξης, είναι δύσκολο να εντοπιστούν, ενώ η ταχύτητα και η διάρκεια της κινητικότητας μπορεί να μειωθούν, σε σύγκριση με το φρέσκο, μη

κατεψυγμένο σπέρμα (Rana, 1995). Λόγω αυτής της επιδείνωσης της κατάστασης των σπερματοζωαρίων και της μεγάλης ποικιλίας στην ποιότητα του αποψυγμένου σπέρματος, αυτό πρέπει να ενεργοποιείται και να έρχεται σε επαφή με τα ωάρια όσον το δυνατό πιο γρήγορα, μετά την απόψυξη του (Lahnsteiner, 2000). Στην ιριδιζουσα πέστροφα, μια καθυστέρηση 30 sec στην ανάμιξη του αποψυγμένου σπέρματος με τα ωάρια των θηλυκών, μειώνει το ποσοστό των βιώσιμων προνυμφών κατά 30% (Rana, 1995).

Η ελαχιστοποίηση του σοκ της οσμωτικής πίεσης κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης, μπορεί να συμβάλλει στην επιμήκυνση της διάρκειας της κινητικότητας (Rana, 1995). Για το αποψυγμένο σπέρμα, το οποίο έχει καταψυχθεί σε "καλαμάκια", χρησιμοποιούνται οι τεχνικές "υγρής" και "ξηρής" γονιμοποίησης. Κατά την υγρή γονιμοποίηση, τα ωάρια τοποθετούνται στο διάλυμα ενεργοποίησης πριν την απόψυξη του σπέρματος και αμέσως μετά την απόψυξη, το σπέρμα αναμιγνύεται με τα ωάρια και ταυτόχρονα ενεργοποιείται από αυτό το διάλυμα. Αντιθέτως, όταν χρησιμοποιείται η "ξηρή γονιμοποίηση", το σπέρμα αρχικά αναμιγνύεται με τα ωάρια και το διάλυμα γονιμοποίησης προστίθεται στη συνέχεια (Lahnsteiner, 2000).

Σχετικά με το διάλυμα ενεργοποίησης, το νερό είναι το λιγότερο αποτελεσματικό, καθώς το ποσοστό των κινητικών σπερματοζωαρίων του αποψυγμένου σπέρματος που ενεργοποιούνται με αυτό είναι χαμηλό και ευμετάβλητο, ενώ τα διαλύματα με υψηλότερη οσμωτική πίεση και αλκαλικό pH, δίνουν σημαντικά καλύτερα αποτελέσματα (Lahnsteiner, 2000). Η σύνθεση αυτών των διαλυμάτων είναι παρόμοια με αυτή του υγρού των ωοθηκών ή έχουν αλατότητα 5‰ και 20‰, για τα είδη γλυκού και θαλασσινού νερού αντίστοιχα. Για τα σολομοειδή, το ρυθμιστικό διάλυμα διτανθρακικού νατρίου 0.1 -0.15 M, χρησιμοποιείται συχνά (Rana, 1995).

4. ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ

4.1 Εισαγωγή

Οι κύριες αιτίες του θανάτου του κυττάρου κατά τη διάρκεια της κρυοδιατήρησης, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, είναι ο σχηματισμός

ενδοκυτταρικών κρυστάλλων και η έκθεση του στην υψηλή συγκέντρωση αλάτων. Η πρόκληση κατά τη διάρκεια της κατάψυξης επομένως είναι να διατηρήσουν, και τα ενδοκυτταρικά και τα εξωκυτταρικά “διαμερίσματα”, μια επαρκή ποσότητα νερού σε υγρή φάση (μη κρυσταλλοποιημένο), ώστε να παραμείνουν οι ηλεκτρολύτες στο διάλυμα (Rana, 1995).

Η κρυσταλλοποίηση μπορεί να αποτραπεί, με την αδρανοποίηση των πιθανών σημείων συμπύκνωσης. Ο παράγοντας που χρησιμοποιείται για αυτό το λόγο, έχει την ικανότητα να ενώνεται με τα μόρια του νερού, διαμέσου των δεσμών οξυγόνου και αναφέρεται ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας. Αυτοί διαφέρουν στην χημική σύσταση τους, αλλά ενεργούν, κατά το μάλλον ή ήττον, με τον ίδιο τρόπο (Li *et al.*, 2006).

4.2 Κρυοπροστατευτικές ουσίες

Τα κρυοπροστατευτικά είναι ουσίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την προστασία βιολογικών ιστών, από τη ζημιά της κατάψυξης (Li *et al.*, 2006).

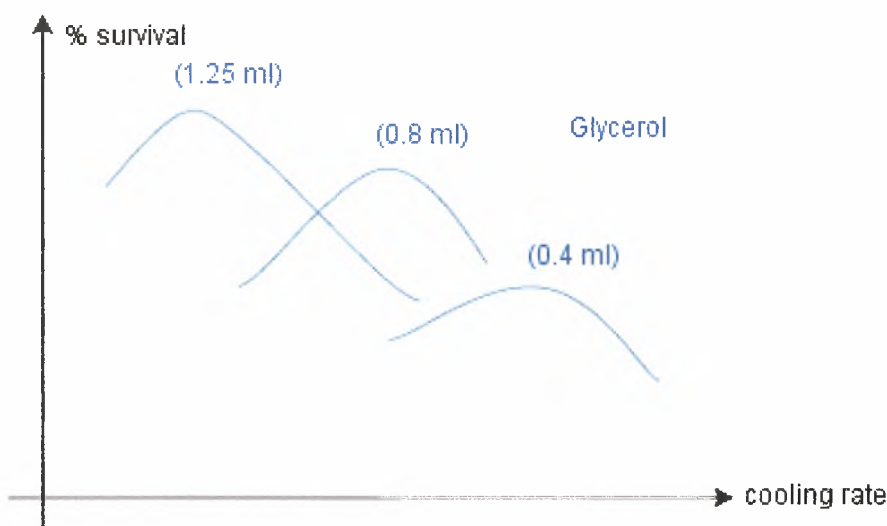
Οι Harvey και ο Carolsfeld (1993), έγραψαν το βιβλίο για την κρυοδιατήρηση του σπέρματος. Αυτοί περιέγραψαν την ανάγκη χρησιμοποίησης κρυοπροστατευτικών, για την διατήρηση της ακεραιότητας του κυττάρου, αποτρέποντας τον γρήγορο σχηματισμό κρυστάλλων νερού (πάγου), εσωτερικά και εξωτερικά του κυττάρου. Η θεωρία τους είναι ότι, εάν ο πάγος σχηματιστεί γρήγορα στο σπέρμα, αυτό “εκρήγνυται”, ενώ εάν σχηματιστεί γρήγορα στο εξωτερικό του κυττάρου, αυτό υφίσταται αφυδάτωση εξαιτίας της αυξανόμενης συγκέντρωσης αλάτων (Powell, 2003).

Έντομα, ψάρια, αμφίβια και ερπετά του Αρκτικού και της Ανταρκτικής, δημιουργούν κρυοπροστατευτικά στο σώμα τους, για να ελαχιστοποιήσουν την ζημιά κατάψυξης κατά τη διάρκεια των κρύων περιόδων χειμώνα (Powell, 2003).

Ανεξαρτήτως της μοριακής τους δομής, όλοι οι κρυοπροστατευτικοί παράγοντες, είναι σε υψηλό βαθμό ευδιάλυτοι στο νερό. Λόγω της ικανότητας τους να σχηματίσουν σταθερούς δεσμούς οξυγόνου με τα μόρια του νερού, μειώνουν το σημείο πήξης οποιουδήποτε διαλύματος, στο οποίο

προστίθενται. Η δεύτερη πολύ σημαντική ιδιότητα των κρυοπροστατευτικών, είναι ότι θεωρητικά δεν είναι τοξικά στα κύτταρα τα οποία προστατεύουν, αλλά στην πράξη, αυτό εξαρτάται από την συγκέντρωσή τους, την τονικότητα του μέσου και τον τρόπο που τα κύτταρα έρχονται σε επαφή με αυτά (Li *et al.*, 2006).

Γενικά, τα κρυοπροστατευτικά προσαρμόζουν το σημείο τήξης ενός διαλύματος, έτσι ώστε η ποσότητα των κρυστάλλων που σχηματίζονται, και κατά συνέπεια, η συγκέντρωση των αλάτων, να μειωθούν (Διάγραμμα 1). Μειώνοντας το σημείο τήξης του εξωκυτταρικού υγρού, εμποδίζουν την έκχυση του ενδοκυτταρικού νερού και έτσι αποτρέπουν την συρρίκνωση του κυττάρου στο ελάχιστο, κρίσιμο σημείο. Μειώνοντας την κυτταρική σύμπτυξη, οι κρυοπροστατευτικές ουσίες μετριάζουν την υπερσυγκέντρωση του ενδοκυτταρικού υγρού και έτσι εμποδίζουν την καθίζηση των πρωτεϊνών (Rana, 1995).



Διάγρ. 1 Συγκέντρωση κρυοπροστατευτικής ουσίας (γλυκερίνης) και ποσοστό επιβίωσης σε σχέση με το ρυθμό κατάψυξης ([www. Cryobiosystem-imv.com](http://www.Cryobiosystem-imv.com)).

Οι ιδανικές κρυοπροστατευτικές ουσίες εισβάλλουν στο κύτταρο, ώστε να ρυθμίσουν τον σχηματισμό κρυστάλλων και επίσης είναι στο εξωτερικό του κυττάρου, για να ελέγχουν την συγκέντρωση αλάτων. Υπάρχουν τρία κύρια συστατικά στις κρυοπροστατευτικές ουσίες, τα οποία είναι τα ενδοκυτταρικά, τα εξωκυτταρικά, καθώς και ένας σταθεροποιητής. Το πιο γνωστό

ενδοκυτταρικό συστατικό, είναι το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Σε πολλές περιπτώσεις, για να διατηρηθεί η ισορροπία άλατος / νερού, προστίθεται ζάχαρη, η οποία δρα σαν αντιψυκτικό. Το τρίτο συστατικό είναι μια πρωτεΐνη, συνήθως γάλα σε σκόνη ή λέκιθος αυγού, τα οποία προστατεύουν την ακεραιότητα της μεμβράνης (Powell, 2003).

Οι κρυοπροστατευτικές ουσίες ταξινομούνται σε διαπερατές και μη-διαπερατές, σύμφωνα με την ικανότητα τους να περάσουν διαμέσου της μεμβράνης. Οι διαπερατές κρυοπροστατευτικές ουσίες όπως το αιθυλένιο, η γλυκόλη του προπυλενίου, η γλυκερίνη, το DMSO και η μεθανόλη, έχουν εξεταστεί για τη κρυοδιατήρηση σπερματοζωαρίων θαλασσινών ψαριών (Suquet *et al.*, 2000).

Η αποτελεσματικότητα των κρυοπροστατευτικών ουσιών, καθορίζεται από την εύθραυστη ισορροπία μεταξύ της τοξικότητας τους και της ικανότητας τους να προστατεύσουν τα κύτταρα από τη ζημιά κατά την κατάψυξη και την απόψυξη και αυτό μπορεί να εξαρτάται από τη συγκέντρωση που χρησιμοποιούνται (Chao *et al.*, 1997). Επομένως, η επιλογή τους, πρέπει να βασίζεται και στα αποτελέσματα των τεστ τοξικότητας και σε αυτά των τεστ κατάψυξης (Sansone *et al.*, 2002).

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός από φόρμουλες για την παραγωγή κρυοπροστατευτικών ουσιών. Εάν αυτό χρησιμοποιηθεί μια φορά σε ένα είδος και πετύχει, αυτό συνήθως γίνεται ο χρυσός κανόνας για αυτό το είδος. Δυστυχώς, η βελτιστοποίηση της φόρμουλας, σπάνια επιτυγχάνεται, γεγονός το οποίο οδηγεί στο δόγμα της παραγωγής κρυοπροστατευτικών ουσιών για κάποιο συγκεκριμένο είδους (Sansone *et al.*, 2002). Ο μεγάλος αριθμός των πιθανών αυτών ουσιών και η διαφορετική συγκέντρωση με την οποία μπορεί να φτιαχτούν, μετατρέπουν την δημιουργία ενός κατάλληλου διαλύματος μια πολύπλοκη εργασία. Επιπλέον, ανάλογα με την συγκέντρωση που χρησιμοποιείται, μερικές κρυοπροστατευτικές ουσίες μπορεί να είναι τοξικές (Melo & Godinho, 2006).

Συμβατικό κρυοπροστατευτικό είναι η γλυκόλη (αλκοόλη που περιέχει τουλάχιστον δυο ομάδες υδροξυλίων), όπως αιθυλενογλυκόλη, η γλυκόλη του προπυλενίου και η γλυκερίνη, ενώ το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), επίσης, θεωρείται κοινή κρυοπροστατευτική ουσία για βιολογικές δομές, όπως οι μεμβράνες (Anchoroguy *et al.*, 1991). Η γλυκερίνη και το DMSO, έχουν

χρησιμοποιηθεί για δεκαετίες από κρυοβιολόγους, για να αποτρέψουν τον σχηματισμό κρυστάλλων στο σπέρμα και τα έμβρυα που κρυοδιατηρούνται σε υγρό άζωτο (Suquet *et al.*, 2000).

Το DMSO, γενικά, θεωρείται ότι δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα και η επιτυχία του, μπορεί να εξηγηθεί, από την πιο γρήγορη διείσδυση του μέσα στα σπερματοζωάρια και από τις αλληλεπιδράσεις του με τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης του σπέρματος (Suquet *et al.*, 2000). Οι Horvath *et al.* (2003), ανέφεραν ότι θεωρείται “καθολική κρυοπροστατευτική ουσία”.

Η ανάλυση κυτταρομετρίας ροής, αποκάλυψε ένα υψηλό ποσοστό των σπερματοζωαρίων στο καλκάνι (*Scophthalmus rhombus*, Linnaeus, 1758) που δεν παρουσίασαν κρυοβλάβη, στην κυτταρική μεμβράνη και στα μιτοχόνδρια, με την παρουσία του DMSO (Suquet *et al.*, 2000). Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην κρυοδιατήρηση του σπέρματος στο λαβράκι (Fauvel *et al.*, 1998) και στα *Mycteroperca bonaci* (Poey, 1860) και *Mycteroperca microlepis* (Goode & Bean, 1879) (Richardson *et al.*, 1999). Παρόλα αυτά αναφερθεί ότι είναι τοξικό σε υψηλές συγκεντρώσεις και η διάρκεια κινητικότητας των σπερματοζωαρίων του *Lates calcalifer* μειώθηκε, όταν η συγκέντρωση του ήταν υψηλότερη από 5% (Suquet *et al.*, 2000).

Οι Aoki *et al.* (1997), ανέφεραν ότι το διάλυμα 10% DMSO, ήταν κατώτερο του DMF (N-διμεθυλοφορμαδεΐδη), στην κρυοδιατήρηση του σπέρματος των *Oryzias latipes* (Temminck & Schlegel, 1846) ενώ οι Rideout *et al.* (2004), επισήμαναν τα καλύτερα κρυοπροστατευτικά αποτελέσματα της γλυκόλης του προπυλενίου (PG), σε σχέση με το DMSO, για τον γάδο (*Melanogrammus aeglefinus*, Linnaeus, 1758) και τον μπακαλιάρο του Ατλαντικού (*Gadus morhua*, Linnaeus, 1758), ενώ τα ίδια αποτελέσματα εμφανίστηκαν και για το σπέρμα των *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum, 1792) (Rideout *et al.*, 2003). Για το *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850), η μεγαλύτερη κινητικότητα παρατηρήθηκε όταν το σπέρμα του υπέστη κρυοδιατήρηση με μεθυλική γλυκόλη, σε σύγκριση με το DMSO και τη μεθανόλη (Maria *et al.*, 2006).

Το DMSO έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες συγκεντρώσεις, ανάλογα με το είδος του ψαριού. Οι Chereguini *et al.* (1997), περιέγραψαν την επιτυχή κρυοδιατήρηση του σπέρματος των ψαριών *Scophthalmus maximus* με διάλυμα κρυοδιατήρησης που περιέχει 10% λέκιθο αυγού και 10% DMSO,

ενώ στον πίνακα που ακολουθεί (Πίν.1)αναφέρονται προτεινόμενες συγκεντρώσεις του DMSO για την κρυοδιατήρηση σπέρματος διάφορων ειδών ψαριού.

Πίν.1 Προτεινόμενες συγκέντρωσεις DMSO concentrations για την κρυοδιατήρηση σπέρματος διαφόρων ειδών ψαριού

Είδος	Συγκέντρωση (%)	Αναφορές
<i>Micropogonias undulatus</i>	15	Gwo <i>et al.</i> 1991
<i>Lates calcarifer</i>	5	Leung 1987
<i>Epinephelus malabaricus</i>	20	Gwo 1993
<i>Pleuronectes ferrugineus</i>	10	Withler & Lim 1982
<i>Macrozoarces americсанus</i>	20	Yao <i>et al.</i> 1995
<i>Clupea pallasi</i>	15	Pillai <i>et al.</i> 1994
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	10	Maisse <i>et al.</i> 1998
<i>Scophthalmus maximus</i>	10	Dreanno <i>et al.</i> 1997
<i>Pleuronectes ferrugineus</i>	10	Richardson <i>et al.</i> 1995

Η μεθανόλη έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετά είδη ψαριών (Harvey, 1983) και βρέθηκε ανώτερη του DMSO στο σπέρμα του κοινού κυπρίνου (Horváth *et al.*, 2003), αλλά οι Suquet *et al.* (2000), ανέφεραν ότι η μεθανόλη έχει χαμηλά ή καθόλου κρυοπροστατευτικά αποτελέσματα στα κατεψυγμένα σπερματοζωάρια των θαλασσινών ψαριών. Παρόλα αυτά, θεωρείται το πιο αποτελεσματικό και γενικώς εφαρμόσιμο κρυοπροστατευτικό για το σπέρμα των σολομοειδών και για τροπικά ψάρια γλυκού νερού, όπως η τιλάπια (*Oreochromis sp.*) και το zebrafish (Lahnsteiner *et al.*, 1997). Η αιθυλενογλυκόλη (EG), παρουσίασε μέτρια αποτελέσματα στα Atlantic croaker και στο yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*, Houttuyn, 1782) (Suquet *et al.*, 2000).

Στα ψάρια εσωτερικών υδάτων, συνήθως, χρησιμοποιούνται μη διαπερατά κρυοπροστατευτικά, όπως οι πρωτεΐνες ή οι λιποπρωτεΐνες (λέκιθος αυγού), για να αποτρέψουν την ζημιά στην κυτταρική μεμβράνη (Suquet *et al.*, 2000).

Το διμεθυλοακεταμίδιο (DMA), χρησιμοποιείται για την ιριδίζουσα πέστροφα. Η γλυκερίνη είναι ένα αποτελεσματικό κρυοπροστατευτικό για το whitefish (*Coregonus muksum*, Pallas, 1814) και τον ιππόγλωσσο του Ατλαντικού (Horváth *et al.*, 2003). Η γλυκόλη προπυλενίου (PG), χρησιμοποιείται με επιτυχία για τα σπερματοζωάρια του σολομού του ατλαντικού και του ιππόγλωσσου του Ατλαντικού. Μείγματα κρυοπροστατευτικών έχουν μικρότερη τοξικότητα και είναι πιο αποτελεσματικά από ότι ένα κρυοπροστατευτικό μόνο του. Ένα μείγμα φορμαμίδιου, με DMSO και γλυκόλη του προπυλενίου, ήταν για πολλά χρόνια το πιο αποτελεσματικό από όλα τα τεχνητά κρυοπροστατευτικά (Ogier de Baulny *et al.*, 1997).

4.3 Διαλύματα αραίωσης σπέρματος (Extenders)

Το σπέρμα μόνο του είναι, συνήθως, μη κατάλληλο για ψύξη (Suquet *et al.*, 2000). Η χρήση των διαλυμάτων αραίωσης σταθεροποιεί τις φυσικοχημικές παραμέτρους, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και για αυτό, παρατείνουν την ζωή των σπερματοζωαρίων (Maria *et al.*, 2006).

Τα τελευταία χρόνια, έχει δοθεί μεγάλη προσοχή στην εξέλιξη των διαλυμάτων αραίωσης σπέρματος των ψαριών. Αυτά τα διαλύματα χρησιμοποιούνται για την αποθήκευση του σπέρματος, με το να διατηρούν τα σπερματοζωάρια σε μια μη ενεργητική, μη κινητική κατάσταση. Η ποικιλία των σχηματισμών, από τα πιο περίπλοκα στα πιο απλά, και η προτυποποίηση δεν έχει γίνει ακόμη γνωστή, ακόμη και για τα πιο γνωστά είδη, όπως η ιριδίζουσα πέστροφα. Ο σχηματισμός, μερικές φορές, βασίζεται στα χημικά συστατικά του σπερματικού πλάσματος, αλλά η οσμωτική πίεση, η ιοντική σύνθεση και το pH, φαίνεται ότι είναι οι πιο σημαντικοί παράγοντες, σχετικά με τον έλεγχο της κινητικότητας (Tiersch, 2001).

Τα διαλύματα αραίωσης σπέρματος συνήθως, βασίζονται σε διαλύματα αλατούχα ή σακχαρώδης, σε οσμωτική πίεση, η οποία εμποδίζει την ενεργοποίηση, και συνήθως διάφορα συστατικά προστίθενται, όπως γάλα, πρωτεΐνες, αμινοξέα και λέκιθος αυγού κότας (Rana, 1995). Συνήθως, ένα απλό διάλυμα βασισμένο στη ζάχαρη, είναι το ίδιο αξιόπιστο για την

κρυοδιατήρηση, όπως αυτά του άλατος. Στην περίπτωση των διαλυμάτων αραίωσης των βασισμένων στη ζάχαρη, μια ζελατινοειδή συγκόλληση του σπέρματος και του κρυοαραιωτικού παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της απόψυξης, σε ορισμένα πειράματα. Όμως, αυτό το φαινόμενο δεν επηρέασε την ικανότητα γονιμοποίησης του σπέρματος (Horvath *et al.*, 2003).

Στα θαλασσινά ψάρια, τα περισσότερα διαλύματα για αραίωση που χρησιμοποιούνται, είναι αλατούχα (1 -10 %) ή ζάχαρης (5 -10 %) (Suquet *et al.*, 2000).

Επειδή η κινητικότητα εξαρτάται από τα εσωτερικά αποθέματα ATP, τα οποία μπορεί να ξανασχηματιστούν μόνο σε πολύ μικρά ποσοστά, τα διαλύματα αραίωσης σπέρματος πρέπει να εμποδίζουν την κίνηση του πριν την κατάψυξη. Παρόλα αυτά, στο καλκάνι, η προσθήκη κρυοπροστατευτικών, όπως το DMSO, αυξάνει την οσμωτική πίεση πάνω από 1100 mOsmol Kg⁻¹ και ενεργοποιεί την κίνηση των σπερματοζωαρίων για μια περίοδο μικρότερη από 1 min. Αυτή η ενεργοποίηση πριν την κατάψυξη, δεν επηρεάζει την ικανότητα του σπέρματος για κίνηση, πιθανόν επειδή τα σπερματοζωάρια του καλκανιού είναι ικανά να ξανασυνθέσουν ενέργεια, κατά την διάρκεια της περιόδου κίνησης του σπέρματος (Suquet *et al.*, 2000).

Οι Mounib *et al.* (1968), επιτυχώς, κρυοδιατήρησαν σπέρμα μπακαλιάρου, χρησιμοποιώντας ένα διάλυμα που περιείχε 40 μέρη από 0.4 M NaCl, 0.1 M γλυκίνη και οκτώ μέρη 1.3% διτανθρακικού νατρίου. Σε μια προσπάθεια να δημιουργηθεί ένα ιδανικό διαλυτικό μέσο για την κατάψυξη του σπέρματος του σολομού του Ατλαντικού δοκίμασαν διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης, μειωμένη γλουταθειόνη και διτανθρακικό κάλιο και συμπέραναν ότι η ιδανική συγκέντρωση είναι 125, 6.5 και 100 M, αντίστοιχα. Το διαλυτικό αυτό έπειτα, χρησιμοποιήθηκε για την κρυοδιατήρηση του σπέρματος του μπακαλιάρου του Ατλαντικού και έχει γίνει γνωστό σαν "Mounib's medium", το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί για την κρυοδιατήρηση σπέρματος πολλών θαλασσινών ειδών ψαριού, όπως του μπακαλιάρου, του λαυρακιού και του καλκανιού (Rideout *et al.*, 2004). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς και στα ψάρια γλυκού νερού, αλλά δεν παρουσίασε καλά αποτελέσματα στην κατάψυξη του σπέρματος του *M. undulatus* (Suquet *et al.*, 2000).

Η αναλογία αραιώσης του σπέρματος με τα διαλύματα αραιώσεως ποικίλει από 1 : 1, έως 1 : 20 (όγκος σπέρματος : όγκος αραιωτικού, $v : v$), με πιο συνηθισμένη ανάμιξη να είναι ένας όγκος σπέρματος, με ένα όγκο διαλύματος (Billard *et al.*, 2003). Μικρότερη βιωσιμότητα του καταψυγμένου – αποψυγμένου σπέρματος, έχει καταγραφεί για αραιώση μεγαλύτερη από 1 : 20 στο Atlantic croaker και μεγαλύτερη από 1 : 50 για το λαβράκι. Η διάρκεια κίνησης των σπερματοζωαρίων του black grouper, μειώνεται από 40 σε 2 min, όταν αυξάνεται η αραιώση του σπέρματος από 1 : 10 σε 1 : 100. Είναι πιθανό οι πρωτεΐνες του πλάσματος του σπέρματος να προστατεύουν την βιωσιμότητα του και υψηλότερη αναλογία αραιώσεως από 1 : 10, ίσως μειώνει αυτή την επίδραση. Αυτό έχει παρατηρηθεί σε ψάρια γλυκού νερού και στο καλκάνι (Suquet *et al.*, 2000).

Στα διαλύματα αραιώσεως σπέρματος συμπεριλαμβάνονται το χλωριούχο νάτριο (NaCl) ή το χλωριούχο κάλιο (KCl), σε συγκέντρωση μικρότερη από 0.1 mM, μετά την τελική αραιώση, και η σακχαρόζη, σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 8 - 8.5 με tris - HCL, έως 150 mM. Ένας συνδυασμός γλυκίνης και tris - HCL, χρησιμοποιείται επίσης σαν ρυθμιστικό διάλυμα. Μετά την ανάμιξη του σπέρματος με το διάλυμα αραιώσεως τα σπερματοζωάρια δεν είναι κινητικά, εξαιτίας της οσμωτικής πίεσης ($> 100\text{mos M / Kg}^{-1}$). Γενικά, δεν χρειάζεται χρόνος εξισορρόπησης και το σπέρμα αναμιγνύεται με το διάλυμα αραιώσεως και αμέσως καταψύχεται. Η εξισορρόπηση, συχνά αναφέρεται σαν επιβλαβή, για το σπέρμα των ψαριών, αλλά οι Jahnichen *et al.* (1999) δεν βρήκαν αλλαγές στην ικανότητα γονιμοποίησης του κατεψυγμένου σπέρματος του *Acipenser ruthenus* (Linnaeus, 1758), έπειτα από 15 min εξισορρόπησης σε διάλυμα με 40% αιθυλική γλυκόλη, σε σύγκριση με το μη εξισορροπημένο δείγμα (Billard *et al.*, 2003).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΖΗΜΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ **ΚΡΥΟΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά τη διάρκεια των χρόνων, όπου η κρυοδιατήρηση σπέρματος χρησιμοποιείται, πρωτόκολλα εμπειρικά προερχόμενα έχουν καθιερωθεί και σημαντικές βελτιώσεις έχουν επιτευχθεί, από την πρώτη επιτυχή κρυοδιατήρηση σπέρματος ρέγκας (*Clupea harengus*, Linnaeus, 1758), πριν 50 χρόνια. Παρόλα αυτά, το κρυοδιατηρημένο σπέρμα διάφορων ειδών ψαριού, δεν χρησιμοποιείται ακόμη ευρέως και σε μεγάλη κλίμακα, εξαιτίας της περιορισμένης βιωσιμότητας του μετά την απόψυξη και επειδή η ικανότητα γονιμοποίησης του κρυοδιατηρημένου σπέρματος μειώνεται δραματικά, σαν αποτέλεσμα της συσσωρευμένης ζημιάς των κυττάρων, οι οποίες προκαλούνται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κατάψυξης - απόψυξης (Li *et al.*, 2006).

Οι διαφορές στα ποσοστά γονιμοποίησης του καταψυγμένου - αποψυγμένου σπέρματος, εξαρτώνται από το είδος και την επιλεγμένη διαδικασία κρυοδιατήρησης (Altunok *et al.*, 2004).

Οι τεχνικές κρυοδιατήρησης του σπέρματος ψαριών που χρησιμοποιούνται, είναι σπάνια τελειοποιημένες και συνήθως βασίζονται στις ήδη υπάρχουσες εργασίες. Το κύριο πρόβλημα στον έλεγχο της ποιότητας του κρυοδιατηρημένου σπέρματος, είναι ότι μεταβάλλεται, καθώς η τεχνική κατάψυξης και αποθήκευσης και τα συστατικά των κρυοπροστατευτικών ουσιών, πρέπει να εξεταστούν, υπολογίζοντας κυρίως την ικανότητα γονιμοποίησης του σπέρματος, λόγω της απουσίας μιας άμεσης μέτρησης της ποιότητας αυτού (Rurangwa *et al.*, 2004).

2. ΚΡΥΟΖΗΜΙΑ ΠΟΥ ΑΚΟΛΟΥΘΕΙ ΤΗΝ ΚΡΥΟΔΙΑΤΗΡΗΣΗ

Η κρυοδιατήρηση των γαμετών περιλαμβάνει ένα σύνολο περίπλοκων, φυσικών και χημικών δραστηριοτήτων, με την “κρυοεπιτυχία” να εξαρτάται από έναν αριθμό συσχετιζόμενων παραγόντων. Η διαδικασία της κρυοδιατήρησης, περιλαμβάνει τα στάδια της μείωσης της θερμοκρασίας, της αφυδάτωσης των κυττάρων, της κατάψυξης και της απόψυξης (Rana, 1995).

Κατά τη διάρκεια της αύξησης ή της μείωσης της θερμοκρασίας, τα κύτταρα υφίστανται σημαντικό, φυσικό και χημικό, τραυματισμό και η ανθεκτικότητα των σπερματοζωαρίων στην κατάψυξη, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες (Aoki *et al.*, 1997). Η μεμβράνη των κυττάρων είναι το πρωταρχικό εμπόδιο, ανάμεσα στο κυτόπλασμα και το περιβάλλον και επομένως, το πρώτο σημείο για τον κρυοτραυματισμό. Αυτά τα τραύματα μπορεί να προέρχονται από την ζημιά κατάψυξης ή από τα υπερτονικά, χημικά αποτελέσματα κατά τη διάρκεια της μείωσης της θερμοκρασίας, από τις αλλαγές στη σύνθεση και τη δομή της μεμβράνης, από την ταχύτητα σχηματισμού και το μέγεθος των κρυστάλλων πάγου που σχηματίζονται και από την αλλαγή του όγκου, η οποία οφείλεται στην αφυδάτωση του κυττάρου (Rana, 1995).

Οι κυτταρικές μεμβράνες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων του σπέρματος, πρέπει να αντέξουν διάφορους στρεσογόνους παράγοντες, κατά τη διάρκεια της κατάψυξης και της απόψυξης. Αυτοί, περιλαμβάνουν την προσθήκη των κρυοπροστατευτικών πριν την κατάψυξη, τις ογκομετρικές μετατροπές, οι οποίες είναι αποτέλεσμα της συρρίκνωσης της μεμβράνης εξαιτίας του υπεροσμωτικού διαλύματος του κρυοπροστατευτικού, καθώς και την προκαλούμενη από την κατάψυξη, αφυδάτωση (Parks & Graham, 1992). Η ζημιά στα κύτταρα, προκαλείται από εύκολα αντιληπτούς μηχανισμούς, σε κάθε μια από τις φάσεις της κρυοδιατήρησης (Li *et al.*, 2006).

Η ποιότητα του σπέρματος που χρησιμοποιείται για την κρυοδιατήρηση, είναι κρίσιμη για την βελτιστοποίηση της βιωσιμότητας του σπέρματος μετά την απόψυξη. Η ιοντική σύνθεση του διαλύματος του σπέρματος, θα επηρεάσει τα χαρακτηριστικά της κατάψυξης και επομένως, η μεταβλητότητα της σύνθεσης του σπερματικού πλάσματος και η επιμόλυνση του, μπορεί να έχουν επιζήμια αποτελέσματα στην βιωσιμότητα του

αποψυγμένου σπέρματος (Rana, 1995). Η κρυοανθεκτικότητα των σπερματοζωαρίων, μπορεί επίσης, να επηρεαστεί από την θερμοκρασία ανάπτυξης και διατροφής των αρσενικών, τα οποία μπορεί να επηρεάσουν την σύνθεση των λιπαρών οξέων και, εξαιτίας αυτού, την ρευστότητα των μεμβρανών (Li *et al.*, 2006).

Οι βλάβες στο σπερματοζωάριο που οφείλονται στην διαδικασία κατάψυξης - απόψυξης, έχουν αναφερθεί σε πολλά είδη ψαριών. Η κρυοδιατήρηση των σπερματοζωαρίων, είναι γνωστό, ότι έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική βλάβη στη δομή του κυττάρου, όπως και στην κυτταρική μεμβράνη, καθώς και στον πυρήνα, στα μιτοχόνδρια και το μαστίγιο. Αυτές οι ζημιές, μπορεί να προκαλέσουν επιπλέον προβλήματα, τα οποία περιλαμβάνουν τη διαρροή και την αλλοίωση των πρωτεϊνών, την παραμόρφωση της δομής των οργανιδίων του κυττάρου και την ανωμαλία της δομής της χρωματίνης του σπέρματος (Li *et al.*, 2006). Το μέγεθος του κρουοτραυματισμού μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της κινητικότητας, σε συνδυασμό με την μειωμένη ταχύτητα και την μειωμένη γονιμότητα των αποψυγμένων σπερματοζωαρίων (Gwo & Arnold, 1992), καθώς και την συντομότερη διάρκεια κινητικότητας (Li *et al.*, 2006).

Το ποσοστό του πλήρως λειτουργικού σπέρματος, που διατηρεί άθικτες μεμβράνες, ουρά και μιτοχονδριακή δραστηριότητα, μετά από τη διαδικασία ψύξης – απόψυξης, είναι χαμηλό (O'Connel *et al.*, 2002) και αυτό κυρίως, οφείλεται στο στρες που προκαλείται από το θερμικό σοκ, στους κρυστάλλους πάγου που σχηματίζονται και στην εκτεταμένη αφυδάτωση κατά την διάρκεια της κατάψυξης, όπως έχει ήδη αναφερθεί (Ho Kang *et al.*, 2004).

Η σχέση μεταξύ της ανθεκτικότητας των κυττάρων στην αφυδάτωση και της προκαλούμενης ζημιάς στα σπερματοζωάρια, απορρέει από τα αποτελέσματα της ιοντικής ισορροπίας (Rana, 1995). Η αύξηση της συγκέντρωσης συγκεκριμένων χημικών ενώσεων και ιόντων, μπορεί να οδηγήσει σε τοξικά αποτελέσματα στο εσωτερικό του κυττάρου. Πρέπει να επισημανθεί, ότι τα κύτταρα που είναι περισσότερο ανθεκτικά στην αφυδάτωση, είναι αυτά που παρουσιάζουν και μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στις χαμηλές θερμοκρασίες (Li *et al.*, 2006).

Η διαφορά των ειδών όσον αφορά την κρυοαντοχή τους, σχετίζεται με τις διαφορές του κάθε είδους στην κατανάλωση ATP και καθορίζεται από τον

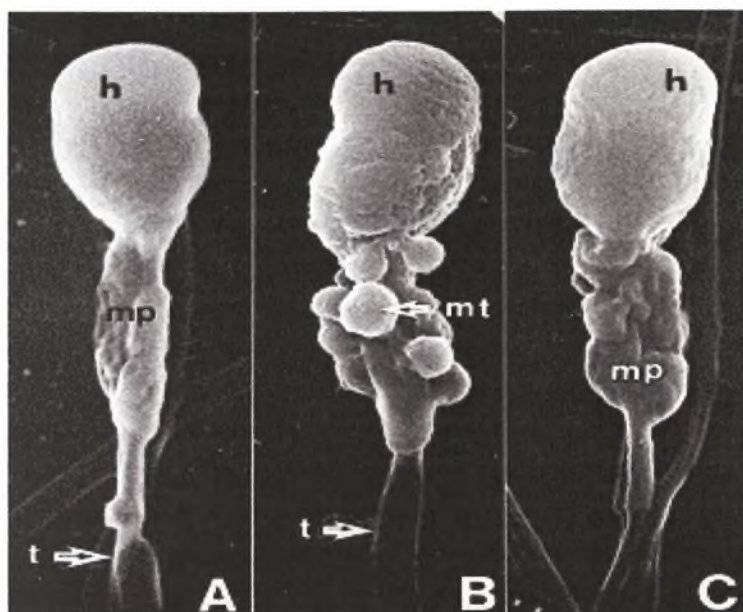
διαφορετικό βαθμό της ζημιάς στις μιτοχονδριακές μεμβράνες και σε αυτές του πλάσματος (Suquet *et al.*, 2000). Τα θαλασσινά ψάρια γενικά, θεωρείται ότι “υποφέρουν” λιγότερο, από τη διαδικασία κατάψυξης – απόψυξης (Scott & Baynes, 1980), πιθανώς εξαιτίας της υψηλής χοληστερόλης που περιέχουν, του ποσοστού φωσφολιπιδίων στην μεμβράνη του σπέρματος και των περιεχόμενων τους σε ATP (Chereguini *et al.*, 2003).

Έτσι, ο προσεκτικός χειρισμός του κρυοδιατηρημένου σπέρματος, είναι πολύ σημαντικός, επειδή η ποιότητα του είναι χαμηλότερη από αυτή του νωπού σπέρματος και πολλά σπερματοζωάρια παρουσιάζουν ζημιά (Lahnsteiner *et al.*, 2003). Οι μεταβολές του γονότυπου του σπέρματος, εξαιτίας της κρυοδιατήρησης, μπορούν να επηρεάσουν την εμβρυική ανάπτυξη και την επιβίωση των προνυμφών μόνο σε αργότερα στάδια, αλλά όχι στα πρώτα στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης, διότι αυτά ελέγχονται από μητρικές κληρονομικές πληροφορίες (Zilli *et al.*, 2005).

2.1 Μορφολογική Ζημιά

Είναι γνωστό, ότι η διαδικασία κρυοδιατήρησης έχει την πιο σημαντική επίδραση στην μορφολογική και λειτουργική ακεραιότητα των σπερματοζωαρίων (Li *et al.*, 2006) και περιλαμβάνει τη ζημιά στο μιτοχόνδριο, στο ακρόσωμα, στην ουρά του σπέρματος, καθώς και την εξασθένηση του σπέρματος (O'Connell *et al.*, 2002).

Η κατάσταση της μεμβράνης του σπέρματος, είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για την επιτυχία της κρυοδιατήρησης (Rana, 1995) και οι Kopeika *et al* (2004), ανέφεραν ότι η κρυοβλάβη στην μορφολογία του σπέρματος και η αύξηση του ποσοστού σπερματοζωαρίων με εξασθενημένες μεμβράνες, μπορεί μερικώς να εξηγήσει την μικρή βιωσιμότητα και το μικρό βαθμό γονιμότητας, που επιτυγχάνεται με το κρυοδιατηρημένο σπέρμα (Silva & Gadella, 2006). Στην πραγματικότητα, η ακεραιότητα της μεμβράνης του πλάσματος και η λειτουργία του μιτοχονδρίου (Εικόνα 3), θεωρούνται οι δυο πιο σημαντικοί παράγοντες για την διατήρηση της βιωσιμότητας του σπέρματος, καθώς εάν η κυτταρική μεμβράνη δεν είναι λειτουργικά άθικτη, το σπέρμα θεωρείται κατεστραμμένο (νεκρό) (Li *et al.*, 2006).



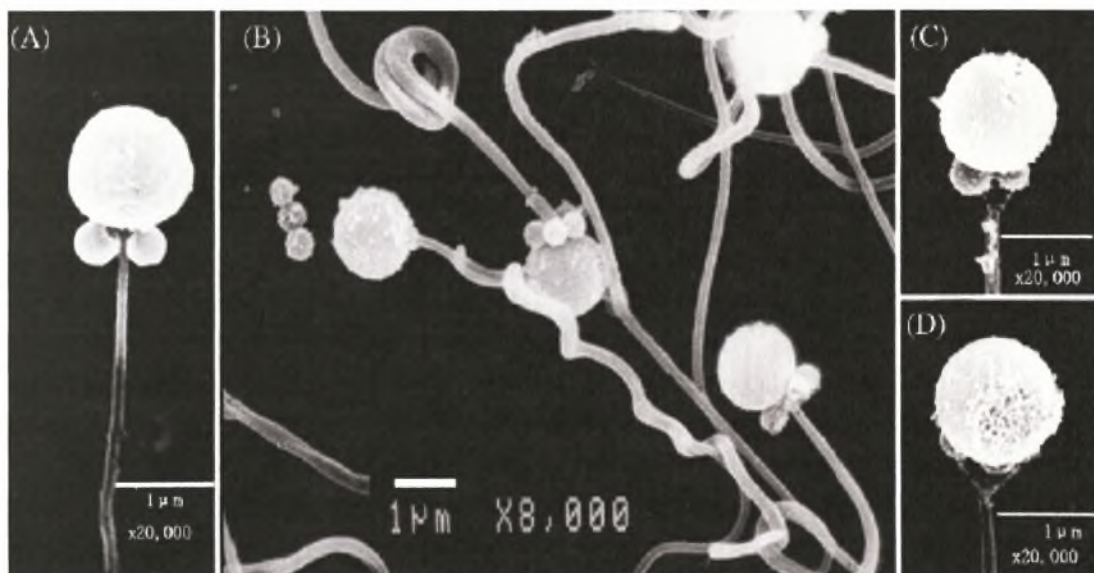
Εικ. 3. Η δομή του νωπού σπέρματος (A), του αποψυγμένου σπέρματος με πολύ διογκωμένα μιτοχόνδρια ή αφυδατωμένη κυτταρική μεμβράνη στο μεσαίο τμήμα (B) και του αποψυγμένου σπέρματος με μικρότερη ζημιά διόγκωσης στο μεσαίο τμήμα. h = κεφαλή σπέρματος, mp = μεσαίο τμήμα, mt = μιτοχόνδρια, t = ουρά σπέρματος ($\times 12,000$) (Yao *et al.*, 2000). Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Το σπέρμα, αποτελείται από διάφορα τμήματα, κλεισμένα, «περιφραγμένα» στο εσωτερικό, σε πλάσμα και μιτοχονδριακές μεμβράνες. Αυτές οι μεμβράνες πρέπει να παραμένουν άθικτες και λειτουργικές, για να καθιστούν το σπέρμα ικανό να γονιμοποιήσει (O'Connell *et al.*, 2002). Οι διαφορές στις συνθήκες εκτροφής των διάφορων ατόμων (τροφή, θερμοκρασία), οδηγούν σε διαφορές στη σύνθεση τις μεμβράνης του πλάσματος, η οποία ίσως επιφέρει βελτιωτικές μετατροπές στην περατότητα του στην κρυστοπροστατευτική ουσία (Ogier de Baulny *et al.*, 1997).

Η κυτταρική μεμβράνη, περιβάλλει ολόκληρο το κύτταρο του σπέρματος, κρατώντας μαζί τα οργάνidia και τα ενδοκυτταρικά συστατικά και μέσω των ημιπερατών χαρακτηριστικών του, διατηρεί το χημικό περιβάλλον των ιόντων και των άλλων διαλυτών συστατικών. Ειδικές πρωτεΐνες της μεμβράνης του πλάσματος, διευκολύνουν την μεταφορά της γλυκόζης και της φρουκτόζης, από το εξωκυτταρικό περιβάλλον, μέσα στο σπέρμα. Αυτοί οι μεταφορείς, είναι απαραίτητο υπόστρωμα πηγής ενέργειας. Στο ώριμο σπέρμα, περίπου το 90% της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) παράγεται με την γλυκόλυση (αναερόβια), καταδεικνύοντας την σημασία των

μονοσακχαριτών, σαν υπόστρωμα για την παραγωγή του ATP (Silva & Gadella, 2006).

Είναι ευρέως γνωστό, ότι η κυτταρική μεμβράνη, είναι το πρωταρχικό μέρος όπου προκαλείται ζημιά κατά την ψύξη ή την θέρμανση και η ανθεκτικότητα του σπέρματος στην ψύξη, καθορίζεται από την βιοχημική σύνθεση της μεμβράνης τους (Ho Kang *et al.*, 2004). Συχνά, η μεμβράνη αποκολλάται από τον κυτοσκελετό ή ακόμη σπάει γύρω από την κεφαλή, το μεσαίο τμήμα και το μαστίγιο. Επίσης μια αλλοίωση της κυτταρικής μεμβράνης, μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα της μεμβράνης του σπέρματος να προκαλέσει συγκερασμό με αυτής του ωαρίου (Ogier de Baulny *et al.*, 1997). Το πάγωμα και το ξεπάγωμα του σπέρματος, προκαλεί την φάση μεταφοράς των λιπιδίων, στην κυτταρική μεμβράνη του σπέρματος και επακόλουθα αυτών των αλλαγών στην δομή τους, οι μεμβράνες αποσταθεροποιούνται, φθείροντας τα μεταφορικά ένζυμα στις μεμβράνες (Ho Kang *et al.*, 2004). Οι μορφολογικές ζημιές που παρατηρούνται στο κατεψυγμένο σπέρμα, είναι τα εξογκώματα και η ρήξη του πλάσματος, στην κεφαλή, το μεσαίο τμήμα και την ουρά, καθώς επίσης και στα μιτοχόνδρια (Εικόνα 4) (Li *et al.*, 2006).



Εικ. 4 (A) Νωπό σπέρμα. (B), (C), (D) Κατεψυγμένο – αποψυγμένο σπέρμα. Είναι ορατή η απώλεια των μιτοχονδρίων(B), η ζημιά της μεμβράνης στην κεφαλή (D), το εξογκώμα του μιτοχονδρίου (C) (Zhang *et al.*, 2003). Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Η αξιολόγηση της μεμβράνης του σπέρματος, μπορεί να οδηγήσει στην αξιολόγηση της επιτυχίας της κρυοδιατήρησης, επειδή οι μεμβράνες είναι υπερβολικά επιρρεπείς στην κρυοβλάβη. Η κρυοζημιά στα κύτταρα του σπέρματος των ψαριών, μπορεί να υπολογιστεί με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και τον έλεγχο της περατότητας τους, σε διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές ουσίες, όπως το SYBP-14, το ιωδιούχο προπιδίο (Propidium Iodide) και τη ροδαμίνη 123 (Rhodamine 123), χρησιμοποιώντας μέθοδο χρώσης με φθορίζουσες ουσίες (Li *et al.*, 2006).

Μετά την κρυοδιατήρηση του σπέρματος του θυμάλου (*Thymallus thymallus*, Linnaeus, 1758), μια σημαντική μείωση της ποιότητας του σπέρματος παρατηρήθηκε και το 40 – 50 % των σπερματοζωαρίων παρουσίασαν ολοκληρωτική ζημιά, το 30 – 40 % υπέστησαν μεταβολές και μόνο το 10 – 20%, ήταν άθικτο μορφολογικά. Παρόμοιες μορφολογικές αλλαγές, επίσης, αναφέρθηκαν στο κατεψυγμένο – αποψυγμένο σπέρμα του Ωκεανικού γατόψαρου, στην ιριδίζουσα πέστροφα και στο *M. undulatus*. Αυτά τα αποτελέσματα, συμφωνούν με τις αναφορές για την κρυοδιατήρηση των σπερματοζωαρίων της ιριδίζουσας πέστροφας, με τη χρήση της ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής (FCM), σε συνδυασμό με τη μέθοδο χρώσης διπλού φθορισμού.. Μερικοί συγγραφείς, ανέφεραν ότι η ρήξη του πλάσματος, μετά την απόψυξη, μπορεί να προκαλείται από τη ζημιά των κυττάρων κατά τη διάρκεια της ενδοκυτταρικής δημιουργίας κρυστάλλων ή από την αστάθεια της μεμβράνης και την απώλεια της ρύθμισης της οσμωτικής πίεσης (Li *et al.*, 2006). Στο κατεψυγμένο – αποψυγμένο σπέρμα της ιριδίζουσας πέστροφας και της “άγριας” πέστροφας (*Salmo trutta*, Linnaeus, 1758), παρουσιάστηκαν σημαντικές μετατροπές στην δομή της χρωματίνης και αυτές οι γονιδιακές αλλαγές, θεωρούνται ικανές να επηρεάσουν την εμβρυική ανάπτυξη και την επιβίωση των προνυμφών (Sucuet *et al.*, 1998). Οι Ogier de Baulny *et al.* (1997), ανέφεραν μια στενή σχέση ανάμεσα στο ποσοστό των κινητικών κατεψυγμένων – αποψυγμένων σπερματοζωαρίων του καλκανιού και της ακεραιότητας της μεμβράνης και αυτή η μελέτη βρήκε ότι, πάνω από το 93% κατεψυγμένων – αποψυγμένων σπερματοζωαρίων, είχαν άθικτη μεμβράνη πλάσματος στο καλκάνι, 45% στην πέστροφα, 80% στην τιλάπια και 90% στο γατόψαρο.

2.2 Φθορά στη φυσιολογία

Η βλάβη στη δομή και η απώλεια της λειτουργικότητας των σπερματοζωαρίων, μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της κινητικότητας του σπέρματος και του ποσοστού επιβίωσης (Ho Kang *et al.*, 2004). Η κινητικότητα, είναι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζονται πιο έντονα από την ψύξη. Είναι επίσης μια σαφή ένδειξη της ικανότητας ενός δείγματος, να επιτύχει τεχνητή γονιμοποίηση και αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό για την εκτίμηση της ποιότητας και του νωπού και του κρυοδιατηρημένου σπέρματος (O'Connel *et al.*, 2002).

Ο μηχανισμός, μέσω του οποίου η κινητικότητα μειώνεται κατά τη διάρκεια της κρυοδιατήρησης, δεν έχει αποσαφηνιστεί, παρόλο που αναγνωρίζεται ως πολύ σημαντικός παράγοντας της κρυοεπιτυχίας. Η κινητικότητα του σπέρματος, μερικώς, εξαρτάται από την λειτουργία των μιτοχονδρίων. Τα μιτοχόνδρια είναι στρατηγικά τυλιγμένα γύρω από το μεσαίο τμήμα, για να παρέχουν προσιτή ενέργεια στο νημάτιο της ουράς και έτσι δίνουν ικανή προώθηση στο σπέρμα. Τα μιτοχόνδρια είναι η κύρια πηγή οξειδωτικής ενέργειας του κυττάρου, μέσω της παραγωγής ATP, διά της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) (O'Connel *et al.*, 2002).

Έχει παρατηρηθεί ότι η κινητικότητα, η ακεραιότητα της μεμβράνης και η λειτουργία του μιτοχονδρίου, επηρεάζονται ομοίως από την κρυοδιατήρηση, καθώς και ότι το πλάσμα και οι μιτοχονδριακές μεμβράνες, είναι ισότιμα ευπαθείς. Η έκταση της ζημιάς, που προκαλείται από την κατάψυξη – απόψυξη στις μεμβράνες του πλάσματος, είναι σχεδόν παρόμοια, με την μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων με λειτουργικό μιτοχόνδριο. Αυτό δείχνει, ότι η μείωση της κινητικότητας μπορεί να εξηγηθεί, από την εξασθένηση της ενεργητικότητας του μιτοχονδρίου (O'Connel *et al.*, 2002).

Τα σπερματοζωάρια των σολομοειδών έχουν ένα μόνο μιτοχόνδριο, το οποίο παίζει κρίσιμο ρόλο στην κινητικότητα. Βλάβη στο μιτοχόνδριο, μπορεί να είναι υπεύθυνη και για την μείωση του ποσοστού της κίνησης των σπερματοζωαρίων και για την διάρκεια της κίνησης μετά την κατάψυξη (Ogier de Baulny *et al.*, 1997)

Η ενεργητικότητα είναι απαραίτητη, και για την κινητικότητα του σπέρματος, και για την γονιμοποίηση. Αυτή η ενεργητικότητα, τροφοδοτείται

στον σχηματισμό της παραγόμενης ATP, είτε μέσω της γλυκόλησης στο κυτταρόπλασμα ή διαμέσου της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) στο μιτοχόνδριο. Οι σχετικές αλληλεπιδράσεις των δυο διαδικασιών για την παραγωγή ATP, είναι μέχρι τώρα ασαφείς. Παρόλα αυτά, η ATP που παράγεται από την OXPHOS στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, μεταφέρεται στους μικροσωληνίσκους για να δώσει ώθηση στην κινητικότητα. Έτσι, η μειωμένη κινητικότητα του σπέρματος, μπορεί να συνδέεται με τη μιτοχονδριακή βλάβη (O'Connell *et al.*, 2002).

Η κινητικότητα του αποψυγμένου σπέρματος, του κοινού κυπρίνου, μειώνεται σημαντικά και μπορεί, να μην φτάσει ούτε το μισό αυτής του αντίστοιχου νωπού, ενώ η αρχική ταχύτητα κίνησης μειώνεται στα 50-60 $\mu\text{m sec}^{-1}$, κατά μέσο όρο. Σε αυτό το είδος, η πλευρική μετατόπιση της κεφαλής (ALH, περίπου 10 μm) και η γραμμικότητα (70-80%), επηρεάζονται λιγότερο από την διαδικασία κατάψυξης - απόψυξης. Παρόλο που η ακριβής κρυοβλάβη, η οποία επιφέρει την μείωση της κολυμβητικής ταχύτητας κίνησης, είναι ακόμα άγνωστη, η μειωμένη ταχύτητα κίνησης, μπορεί να ελαττώσει την πιθανότητα για τα σπερματοζωάρια, να φτάσουν στην μικροπύλη (Li *et al.*, 2006).

Στην ιριδίζουσα πέστροφα, η κρυοδιατήρηση, επίσης, επιφέρει αλλαγές στην συνολική κινητικότητα και έτσι αυτή αλλάζει από κυκλική σε γραμμική για το αποψυγμένο σπέρμα, το οποίο προκαλείται από την μείωση των ενδοκυτταρικών αποθεμάτων Ca^{2+} , εξαιτίας της διαρροής της μεμβράνης (Li *et al.*, 2006). Οι Dreanno *et al.* (1997), ανέφεραν, ότι στην κρυοδιατήρηση του σπέρματος του καλκανιού, το ποσοστό των κινητικών, καταψυγμένων - αποψυγμένων σπερματοζωαρίων ήταν, επίσης, σημαντικά μειωμένο, σε σύγκριση με αυτό του νωπού σπέρματος, ενώ η ταχύτητα και η διάρκεια της κίνησης δεν τροποποιήθηκε αρκετά (Li *et al.*, 2006). Οι Billard *et al.* (2000), ανέφεραν ότι στο καλκάνι, παρόλο που το ποσοστό της κινητικότητας μειώνεται δραστικά μετά την απόψυξη, τα κινητικά σπερματοζωάρια, έχουν τα ίδια χαρακτηριστικά κίνησης με αυτά του νωπού σπέρματος. Παρόλα αυτά, η κολυμβητική ταχύτητα κίνησης των σπερματοζωαρίων, σε άλλα πειράματα, δεν επηρεάστηκε από την διαδικασία της κρυοδιατήρησης (Li *et al.*, 2006).

Η μελέτη του κατεψυγμένου – αποψυγμένου σπέρματος του στουργιονιού της Σιβηρίας, κατέδειξε μερικές μορφολογικές αλλαγές στην

ουρά, κατά τη διάρκεια της φάσης κινητικότητας, σε σύγκριση με το φυσικό σπέρμα. Μετά την απόψυξη, πολλά μη ενεργητικά σπερματοζωάρια παρουσίασαν τοπικές ανωμαλίες, όπως περιορισμένη διατάραξη του αξονήματος, αλλά αυτά τα σπερματοζωάρια μπορούν να ξεκινήσουν την κινητικότητα με τον σχηματισμό παλινδρομικών κινήσεων του μαστιγίου, παρόμοια με αυτό που παρατηρείται στο φυσικό σπέρμα. Κατά τη διάρκεια της κινητικής φάσης, οι κινήσεις του μαστιγίου των αποψυγμένων σπερματοζωαρίων, γίνονται ασύμμετρες και η κολυμβητική επίδοση μειώνεται πιο γρήγορα από αυτή του άθικτου δείγματος ελέγχου (Billard *et al.*, 2000).

Στο σολομό του Ατλαντικού, η κινητικότητα είναι παρόμοια στο φυσικό και στο κατεψυγμένο – αποψυγμένο σπέρμα. Στα στουργιόνια, η κατάσταση μοιάζει να είναι διαφορετική, καθώς η διαδικασία κατάψυξης – απόψυξης, προκαλεί κάποια ζημιά στο μαστίγιο των κινητικών σπερματοζωαρίων και επομένως, κάποιες αλλαγές στις παραμέτρους της κινητικότητας, με μια τελική μείωση της απόδοσης της (Billard *et al.*, 2000). Ακόμη, στο κρυοδιατηρημένο σπέρμα των κυπρινοειδών, γενικά, έχει αναφερθεί μειωμένη κινητικότητα, κολυμβητική ταχύτητα και διάρκεια της κινητικότητας, σε σύγκριση με αυτά του νωπού σπέρματος (Lahnsteiner *et al.*, 2003).

Οι Ogier de Baulny *et al.* (1997), ανέφεραν ότι στην ιριδίζουσα πέστροφα, μετά την κατάψυξη - απόψυξη, πολύ λίγα σπερματοζωάρια είναι ικανά να ενεργοποιηθούν και η διάρκεια της κίνησης είναι, επίσης, μειωμένη. Αυτό μπορεί να συμβαίνει, μερικώς, εξαιτίας του χαμηλότερου περιεχομένου του κυττάρου σε ATP μετά την κρυοδιατήρηση. Σε αυτή την μελέτη, βρέθηκε ότι η διαδικασία κατάψυξης - απόψυξης προκαλεί μια απώλεια της ATP, η οποία ποικίλει, ανάλογα με τα κρυοπροστατευτικά που χρησιμοποιούνται. Αυτή η απώλεια, μπορεί να οφείλεται στην κατανάλωση ATP από το κύτταρο ή στην υποβάθμιση του, από το ATP που εκλύεται στο διάλυμα αραίωσης που το περιβάλλει. Όμως, η κατάψυξη μιας γνωστής ποσότητας ATP, με διάλυμα Mounib και την προσθήκη 10% λέκιθο αυγού και 10% Me₂SO, δεν είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του αρχικού επιπέδου ATP. Πρέπει λοιπόν να δοθεί μεγαλύτερη σημασία, στην υπόθεση της κατανάλωσης ATP από το κύτταρο, κατά τη διάρκεια του κύκλου κατάψυξης – απόψυξης. Η κατανάλωση της ATP, μπορεί να οφείλεται στο οσμωτικό στρες κατά τη διάρκεια της

πρόσθεσης των κρυοπροστατευτικών ή της κατάψυξης του εξωτερικού νερού (Ogier de Baulny *et al.*, 1997).

Το ποσοστό της κινητικότητας μετά την απόψυξη στα σπερματοζωάρια των σολομοειδών, είναι χαμηλό και συνήθως δεν υπερβαίνει το 5 - 20%, συνοδευόμενο και από μια σημαντική διαρροή ενζύμων. Αυτό δείχνει μια σοβαρή ζημιά στα περισσότερα κύτταρα. Κατά την γονιμοποίηση, χρησιμοποιώντας υπερβολική ποσότητα κρυοδιατηρημένου σπέρματος ανά αυγό, μπορεί να ξεπεραστεί το πρόβλημα της χαμηλής κινητικότητας. Παρόλα αυτά, το ποσοστό γονιμοποίησης που επιτυγχάνεται με το κρυοδιατηρημένο σπέρμα, είναι, συνήθως, χαμηλότερο από ότι το νωπό σπέρμα. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην γονιδιακή βλάβη, καθώς το σπερματοζωάριο εισχωρεί σε μια μικροπύλη, αλλά ο «τραυματισμένος» πυρήνας των γονιδίων του, δεν μπορεί να σχηματίσει ένα βιώσιμο ζυγωτό, μετά την συγχώνευση με τον προπυρήνα των θηλυκών. Τα σπερματοζωάρια που περιέχουν άθικτα γονίδια, όμως, μπορούν να συνεισφέρουν σε ζώντα ζυγωτά, τα οποία εξελίσσονται σε υγιή άτομα (Babiak *et al.*, 2002a).

Το ποσοστό κινητικότητας κατεψυγμένων σπερματοζωαρίων, είναι πολύ πιο υψηλό στα θαλασσινά είδη ψαριών (Chereguini *et al.*, 1997), σε σύγκριση με αυτά του γλυκού νερού (21% στην ιριδίζουσα πέστροφα, 25% στον κυπρίνο και από 40 έως 85% στην τιλάπια). Στα θαλασσινά είδη, ο υψηλός δείκτης κινητικότητας του κατεψυγμένου - αποψυγμένου σπέρματος, έχει ως αποτέλεσμα επίσης, τον υψηλό δείκτη γονιμοποίησης, όπως καταγράφεται στο λαβράκι (65%) και στο καλκάνι, (83%) (η γονιμοποίηση εκφράζεται σαν ποσοστό του δείγματος ελέγχου του νωπού σπέρματος), χρησιμοποιώντας περιορισμένη ποσότητα σπέρματος (Suquet *et al.*, 2000).

2.3 Βιοχημικές και μεταβολικές αλλαγές

Πρόσφατες μελέτες στα βιοχημικά χαρακτηριστικά, για την εκτίμηση των αλλαγών που επέρχονται σε αυτά, κατά τη διάρκεια της κρυοδιατήρησης, βασίζονται στην υπόθεση ότι η ζημιά στα κύτταρα του σπέρματος κατά τη διαδικασία της κατάψυξης - απόψυξης, μπορεί να παρακολουθηθεί με την μέτρηση των επιπέδων μερικών συστατικών, κυρίως των ενζύμων και

ορισμένων μεταβλητών στο σπερματικό υγρό, πριν και μετά την κρυοδιατήρηση. Η ανεπάρκεια ή η χαμηλή δραστηριότητα των ενζύμων, μπορούν, πιθανώς, να διακόψουν τα μεταβολικά μονοπάτια και να περιορίσουν την βιωσιμότητα του σπέρματος ή να εμποδίσουν το σπέρμα, να εισχωρήσει στην μικροπύλη του ωαρίου (Li *et al.*, 2006).

Ο εντοπισμός αυτών των συστατικών στα σπερματοζωάρια, μπορεί να επισημάνει σε ποια δομή έχει προκληθεί βλάβη και να επιτρέψει την καλύτερη κατανόηση του ρόλου που παίζουν αυτά τα συστατικά, στις μεταβολικές αλλαγές του σπέρματος, κατά τη διαδικασία της κρυοδιατήρησης του. Προηγούμενες μελέτες της δραστηριότητας της L- γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) και της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AspAT) είναι πολλά υποσχόμενα τεστ, για την εκτίμηση της ποιότητας του νωπού σπέρματος στα ψάρια (Ciereszko & Dabrowski, 1994).

Οι Lahnsteiner *et al.* (1996), εκτίμησαν τη δραστηριότητα των ένζυμων στο νωπό και το κρυοδιατηρημένο σπέρμα της ιριδίζουσας πέστροφας. Η δραστηριότητα της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης, της μηλικής αφυδρογονάσης (MDH), της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) και της ATP, ήταν σημαντικά χαμηλότερη στο αποψυγμένο σπέρμα, από ότι στο σπέρμα του νωπού δείγματος. Επομένως, η επίδραση της κρυοβλάβης στο μεταβολισμό του σπέρματος, μπορεί να παρακολουθηθεί από την δραστηριότητα ορισμένων ενζύμων, που ελευθερώνονται από τα σπερματοζωάρια, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κατάψυξης και απόψυξης και να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της επιτυχίας της κρυοδιατήρησης. Αποτελέσματα εργασιών, ανέφεραν την στατιστικά αξιόπιστη σχέση μεταξύ της δραστηριότητας των ενζύμων, των οργανικών συστατικών του σπέρματος και του ποσοστού γονιμοποίησης του κρυοδιατηρημένου σπέρματος (Li *et al.*, 2006).

Η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) στο σπερματικό υγρό, σχετίζεται, με τη χαμηλή ποιότητα του σπέρματος για κρυοδιατήρηση. Μια σημαντικά αρνητική σχέση, μεταξύ της ικανότητας γονιμοποίησης του αποψυγμένου σπέρματος και της δραστηριότητας του φωσφορικού οξέος (AcP) και μια θετική γραμμική υποστροφή, για τη δραστηριότητα της αδενυλικής κινάσης, έχει αναφερθεί. Μια σημαντικά αρνητική σχέση, επίσης, αναφέρθηκε μεταξύ του ποσοστού των προνυμφών που εκκολάφθηκαν και της δραστηριότητας της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AspAT) ή της LDH από τα

κρυοτραυματισμένα σπερματοζωάρια της ιριδίζουσας πέστροφας (Li *et al.*, 2006), ενώ θετική σχέση παρατηρήθηκε ανάμεσα στη δραστηριότητα των AspAT, AcP και LDH (Babiak *et al.*, 2001).

Η ατέλεια στις πρωτεΐνες του σπέρματος, μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την κινητικότητα του σπέρματος, την ικανότητα γονιμοποίησης του και τα πρώτα στάδια μετά την γονιμοποίηση (Zilli *et al.*, 2005). Οι Babiak *et al.* (1997), ανέφεραν ότι το πρωτεϊνικό προφίλ του κατεψυγμένου - αποψυγμένου σπέρματος, μοιάζει με αυτό του νωπού σπέρματος, αλλά, οι Zilli *et al.* (2005), επισήμαναν ότι κάποιες διαφορές έχουν παρατηρηθεί. Η μείωση της αφθονίας των πρωτεϊνών μετά την κρυοδιατήρηση, μπορεί να οφείλεται είτε στη διαρροή πρωτεϊνών από τα σπερματοζωάρια στο εξωκυτταρικό μέσο, είτε στην υποβάθμιση που ακολουθεί το στρες αυτής διαδικασίας.

2.4 Ζημιά στο DNA

Διάφορες μελέτες απέδειξαν την παρουσία ζημιάς στα αποψυγμένα σπερματοζωάρια, που σχετίζονται με την απώλεια της κινητικότητας και της γονιμότητας, τα χαμηλά περιεχόμενα της ATP, την ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης, την ακεραιότητα του μιτοχονδρίου και την λειτουργία του κρυοδιατηρημένου σπέρματος. Παρόλα αυτά, αυτοί οι παράμετροι δεν παρέχουν πληροφορίες, σχετικά με την ακεραιότητα του DNA και της χρωματίνης (Cabrita *et al.*, 2005).

Η ακεραιότητα του πατρικού DNA, είναι καίριας σημασίας για την περαιτέρω ανάπτυξη ενός εμβρύου. Ο βαθμός της ζημιάς του DNA, σχετίζεται καθαρά με την μειωμένη ανάπτυξη του εμβρύου και σοβαρή ζημιά, θεωρείται ικανή να προκαλέσει στειρότητα του αρσενικού (Silva & Gadella, 2006). Η εκτίμηση της ζημιάς του DNA του κρυοδιατηρημένου σπέρματος, μπορεί να είναι ιδιαίτερως σημαντική για την κρυοδιατήρηση ή για την αξιολόγηση δειγμάτων αποθηκευμένων σε τράπεζες γαμετών, επειδή η απώλεια γενετικών πληροφοριών και η εμφάνιση δύσμορφων λάβρων, λόγω αυτής της ζημιάς, δεν μπορούν να αποδειχθούν με άλλο τρόπο (Cabrita *et al.*, 2005).

Η ζημιά στο DNA των σπερματοζωαρίων, έχει παρατηρηθεί σε διάφορα θηλαστικά, όπως στον άνθρωπο, το ποντίκι, το άλογο, το γουρούνι,

χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές. Επίσης, πολλοί συγγραφείς έχουν αναφερθεί στο σπάσιμο του DNA στα κρυοδιατηρημένα σπερματοζώαρια και συσχετίζουν αυτά τα ευρήματα, με την μείωση στη γονιμότητα και την ανώμαλη διχοτόμηση του εμβρύου στον άνθρωπο και το ποντίκι. Επιπλέον, υπάρχουν μερικές αποδείξεις ότι οι αλλαγές στο γενετικό υλικό αυτών των σπερματοζωαρίων, κληρονομούνται στους απογόνους (Cabrita *et al.*, 2005).

Σημαντικές διαφορές στην μορφολογία και στη συμπεριφορά των ποντικιών, που προέχονται από φρέσκα και από κρυοδιατηρημένα έμβρυα, έχουν αναφερθεί (Dulioust *et al.*, 1995). Υψηλότερη ανοσολογική αντιδραστικότητα, επίσης, παρατηρήθηκε σε νεαρούς κυπρίνους, που προήλθαν από ωάρια που γονιμοποιήθηκαν από κρυοδιατηρημένο σπέρμα (Cabrita *et al.*, 2005) .

Η επιδείνωση του σπέρματος στο επίπεδο του DNA, μπορεί και να μην επηρεάσει το ποσοστό γονιμοποίησης, εφόσον οι μεμβράνες και τα οργανίδια του σπέρματος, παραμένουν λειτουργικά άθικτα. Παρόλα αυτά, η ζημιά του DNA, οδηγεί σε μειωμένη ανάπτυξη του εμβρύου, μετά την εκδήλωση του εμβρυικού γενότυπου. Έτσι, από τη μια, το άθικτο λειτουργικά σπέρμα, είναι απαραίτητο στο να επιτύχει γονιμοποίηση, αλλά δεν συνεισφέρει ουσιαστικά, στις μετέπειτα διαδικασίες μετά την σύλληψη, και από την άλλη το DNA του σπέρματος δεν έχει λειτουργία στο να επιτύχει γονιμοποίηση, αλλά συμμετέχει σημαντικά στην εμβρυική ανάπτυξη, από την έναρξη της έκφρασης του DNA του εμβρύου. Επομένως, και η επιδείνωση της μεμβράνης του σπέρματος και αυτή του DNA, είναι σημαντικοί παράγοντες που συμμετέχουν στην υπογονιμότητα ή την στειρότητα των αρσενικών (Silva & Gadella, 2006).

Διάφοροι συγγραφείς, υποστηρίζουν ότι η κρυοδιατήρηση μπορεί να επιφέρει την αστάθεια του DNA, το οποίο μπορεί να επιδιορθωθεί από τις ωοθήκες μετά την γονιμοποίηση. Έχει αποδειχθεί ότι, τα διαφορετικά επίπεδα της περιεχόμενης χρωματίνης και η διαφορετική αναλογία ιστόνης / πρωταμίνης, στα σπερματοζώαρια διάφορων ειδών, είναι υπεύθυνα για το πόσο ευάλωτο είναι το DNA σε μερικά είδη (π.χ. στον άνθρωπο), ενώ δεν είναι σε άλλα (π.χ. στους αγριόχοιρους) (Cabrita *et al.*, 2005).

Η φύση της ζημιάς του DNA δεν είναι καθαρή, αλλά τα στοιχεία έδειξαν ότι η διαδικασία κατάψυξης – απόψυξης, μπορεί να προκαλέσει ζημιά μεγαλύτερη από αυτή της τοξικότητας των κρυοπροστατευτικών. Έχει

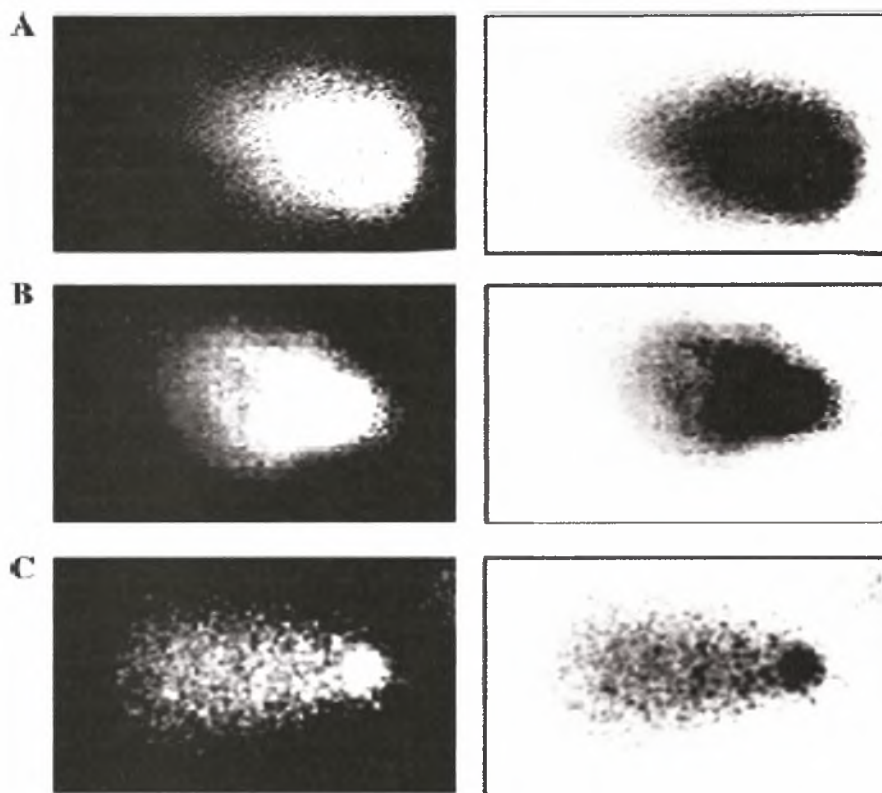
αναφερθεί, ότι μια αύξηση στο ενδοκυτταρικό ασβέστιο που προκαλείται από την κρυοδιατήρηση, μπορεί να αυξήσει τη συχνότητα του θρυμματισμού του πυρηνικού DNA, διαμέσου της ενδοπυρηνικής ενεργοποίησης. Επιπρόσθετα, η παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), που προκαλείται από την κρυοδιατήρηση, μπορεί να είναι υπεύθυνη για μια αύξηση στην υπεροξειδωτικότητα, που οδηγεί στον θρυμματισμό του DNA. Το σπάσιμο του νήματος, μπορεί να προκληθεί απευθείας από γονοτοξικά συνθετικά, αλλά η υπόθεση ότι τα κρυοπροστατευτικά μπορεί να έχουν κάποια ευθύνη για αυτή τη ζημιά, πρέπει να απορριφθεί αναφορικά με το DMSO (Cabrita *et al.*, 2005).

Μελέτες που έγιναν στο λαβράκι δεν έδειξαν μεγάλες διαφορές στο ποσοστό εκκόλαψης, όταν νωπό ή κρυοδιατηρημένο σπέρμα παρατηρήθηκε. Είναι πιθανό, ότι εξαρτώμενα από την φύση ή το βαθμό της ζημιάς, αυτή να μπορεί να διορθωθεί από τον μηχανισμό επιδιόρθωσης των ωοθηκών, κατά την διάρκεια της πρώτης εμβρυογέννησης και έτσι να μην επηρεάσει την ανάπτυξη του εμβρύου, αλλά μεγάλη ζημιά θα επιφέρει αλλαγές στην ανάπτυξη του εμβρύου, μειώνοντας την ικανότητα εκκόλαψης (Cabrita *et al.*, 2005). Για παράδειγμα, η χρήση του 3-αμινοβενζαμιδίου, για να μπλοκάρει το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA στα έμβρυα του ψαριού κωβίτις (*Misgurnus fossilis*, Linnaeus, 1758), ενισχύει την εξελικτική αποτυχία, που αποδίδεται στη ζημιά του DNA του σπέρματος μετά την κατάψυξη (Koreika *et al.*, 2004).

Οι Cabrita *et al.* (2004), χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Comet Assay, φανέρωσαν μια ζημιά 30,3% στο DNA για το κρυοδιατηρημένο σπέρμα, έναντι 11,1% ζημιά στο DNA, για το νωπό σπέρμα του λαβρακιού και ανέφεραν ότι το ποσοστό του νουκλεϊδίου, ήταν σημαντικά μειωμένο μετά την κατάψυξη. Μελέτες στην ιριδιζουσα πέστροφα και στην τσιπούρα (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758), απέδειξαν ότι ο θρυμματισμός του DNA, είναι ακόμη ένας κρυοτραυματισμός του σπέρματος, σε αυτά τα είδη (Cabrita *et al.*, 2004).

Η ζημιά στην χρωματίνη, μπορεί επίσης, να είναι υπεύθυνη για την μείωση της ικανότητας εκκόλαψης, η οποία πάντα αποδίδονταν στην αποτυχία της γονιμοποίησης, λόγω της ζημιάς στην κυτταρική μεμβράνη. Έτσι, το σπέρμα της ιριδιζουσας πέστροφας υπόκειται σε ζημιά, σε διάφορα στάδια κατά την κρυοδιατήρηση και το σύνολο των διαφόρων τύπων ζημιάς, μπορεί να είναι υπεύθυνο για τη μείωση στο ποσοστό της εκκόλαψης που επιτυγχάνεται (Cabrita *et al.*, 2005). Επίσης, με τη μέθοδο Comet Assay στο

σπέρμα του λαβρακιού (Εικόνα 5), έγινε φανερό ότι ένα σημαντικό επίπεδο του θρυμματισμού του DNA, συμβαίνει στα δείγματα των κατεψυγμένων - αποψυγμένων σπέρματος, σε σύγκριση με αυτά του νωπού, ενώ το πρωτόκολλο κρυοδιατήρησης δεν επηρεάζει, είτε το ποσοστό του κινητικού σπέρματος, είτε το ποσοστό γονιμοποίησης (Li *et al.*, 2006).



Εικ. 5 Αποτελέσματα μεθόδου SCEG για (Α) νωπό, (Β) κατεψυγμένο - αποψυγμένο και (C) μη προστατευμένο κατεψυγμένο – αποψυγμένο σπέρμα.
(Li *et al.*, 2006)

Διάφορες μελέτες, απέδειξαν ότι όταν διμεθυλοσουλφοξείδιο και αλβουμίνη ορού βοός (BSA) προστίθενται στο διάλυμα των διαλυμάτων αραίωσης, η ζημιά στο DNA του σπέρματος του λαβρακιού, μειώνεται σημαντικά, όταν συγκριθεί με σπερματοζωάρια που καταψύχθηκαν μόνο με διάλυμα αραίωσης, χωρίς την παρουσία κρυοπροστατευτικών ουσιών (Zilli *et al.*, 2003). Επίσης οι Labbe *et al.* (2001), έδειξαν ότι η απλή έκθεση του σπέρματος της ιριδίζουσας πέστροφας, σε διάλυμα κατάψυξης που περιέχει 10% DMSO, δεν προκάλεσε σημαντικό θρυμματισμό στο DNA των σπερματοζωαρίων (Cabrita *et al.*, 2005).

3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΖΗΜΙΑΣ ΣΤΟ DNA

3.1 Εισαγωγή

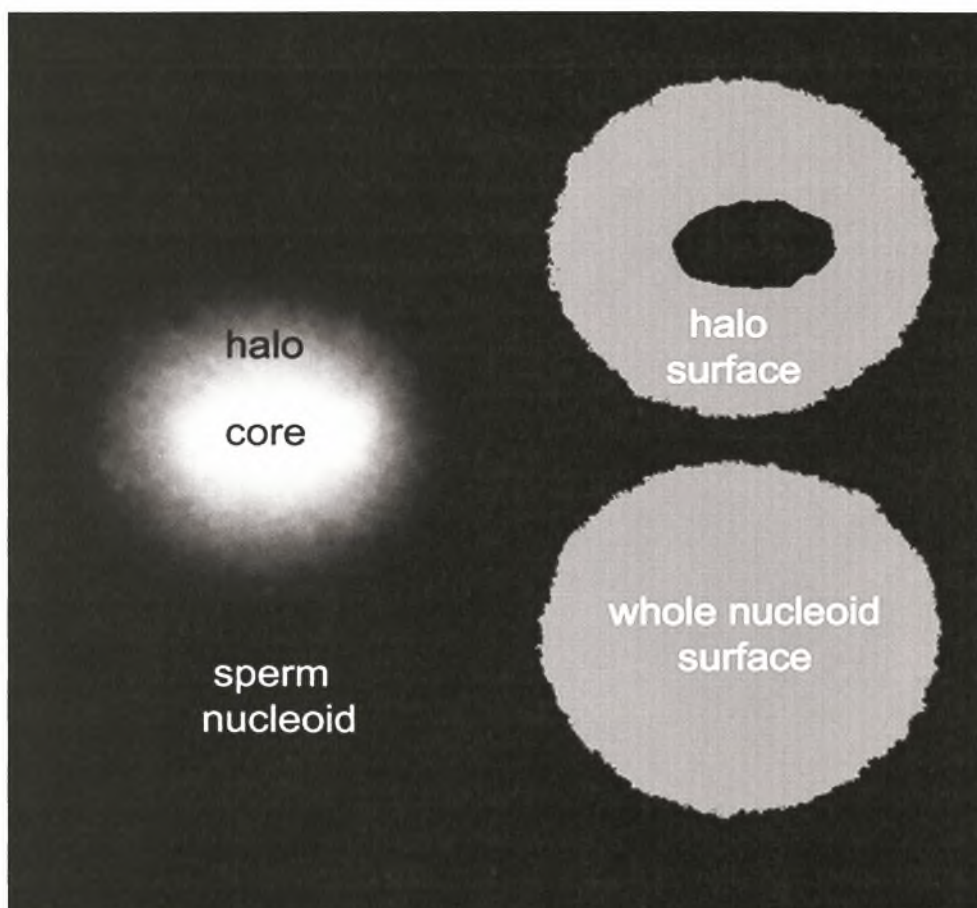
Η ρήξη του DNA του σπέρματος (DNA fragmentation), αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο σαν ένας σημαντικός παράγοντας της μη γονιμότητας (Fernantez *et al.*, 2003). Πρόσφατες κλινικές μελέτες, απέδειξαν ότι η ρήξη του DNA σε ποσοστό πάνω από 30%, δεν είναι συμβατή με την έναρξη και την διατήρηση του κύκλου της κύησης (Larson *et al.*, 2000).

Διάφορες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για την εξέταση της γενετικής ακεραιότητας του σπέρματος (Cabrita *et al.*, 2005), ενώ σήμερα ένας μεγάλος αριθμός τεστ, είναι διαθέσιμος για τον υπολογισμό της ρήξης του DNA του σπέρματος (Fernantez *et al.*, 2003). Αυτές περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, την Comet Assay (Hughes *et al.*, 1996), το τεστ της χρωμομυκίνης A3 (Chromomycin A3) (Manicardi *et al.*, 1995), το DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization (DBD-FISH) (Fernández *et al.*, 1998), καθώς και το SCSA τεστ (Evenson *et al.*, 1999). Η μέθοδος του ελέγχου της δομής της χρωματίνης του σπέρματος (Sperm Chromatin Structure Assay, SCSA), μετράει την ευπάθεια του DNA στην αλλοίωση των οξέων (Zilli *et al.*, 2003). Η DNA Laddering, επίσης, χρησιμοποιήθηκε για την απόκτηση μιας ποιοτικής ανάλυσης του σπέρματος, ενώ η μέθοδος Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Nick-end Labelling (TUNEL), είναι μια άλλη τεχνική για την αναγνώριση της ρήξης της αλυσίδας του DNA (Fernández *et al.*, 1998).

3.2 Τεστ ανάλυσης της διασποράς χρωματίνης των σπερματοζωαρίων (Sperm Chromatin Dispersion Test)

Όταν τα σωματικά κύτταρα ή τα σπερματοζωάρια με μη κατακερματισμένο DNA, βυθίζονται σε αγαρόζη και απευθείας εκτίθενται σε διάλυμα λύσης, τα αποπρωτεϊνισμένα νουκλεοτίδια, εμφανίζουν εκτεταμένη στεφάνη της διασποράς του DNA, όπως παρατηρείται σε μικροσκόπιο

φθορισμού, αφού πρώτα χρησιμοποιηθεί ειδικό διάλυμα φθορισμού (Εικόνα 6) (Ankem *et al.*, 2002). Η στεφάνη σχετίζεται με τις χαλαρωμένες θηλιές που είναι προσκολλημένες στο υπόλοιπο της πρωτεϊνικής δομής. Η ύπαρξη ρήξης του DNA, προάγει την διαστολή της στεφάνης των νουκλεοτιδίων και αυτή είναι η βάση για το τεστ, να ανιχνεύσει την ζημιά στο DNA (Fernantez *et al.*, 2003).



Εικ 6 Κατάδειξη του τρόπου που το συγκριτικό μέγεθος της στεφάνης λαμβάνεται από την Ψηφιακή Ανάλυση Εικόνας (digital image analysis, DIA). Το χρωματισμένο νουκλεοτίδιο του σπέρματος (αριστερά) περιέχει ένα κεντρικό πυρήνα και μια περιφερειακή στεφάνη διασκορπισμένων θηλιών. Χρησιμοποιώντας λογισμικό DIA, το συγκριτικό μέγεθος της στεφάνης προέρχεται από την επιφάνεια αυτής και την ολική επιφάνεια του νουκλεοτιδίου. Διαιρώντας την επιφάνεια της στεφάνης (επάνω δεξιά), με τη συγκριτική ολική επιφάνεια του νουκλεοτιδίου (κάτω δεξιά), αποκτάται το σχετικό μέγεθος της στεφάνης, όπως αυτό σχετίζεται στο νουκλεοτίδιο (Fernantez *et al.*, 2003).

3.3 Commet Assay

3.3.1 Ηλεκτροφόρηση DNA μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης

Η τεχνική που χρησιμοποιείται για την μέτρηση των βλαβών που προκαλούνται στο DNA, μετά από έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂, είναι η ηλεκτροφόρηση DNA μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE), που είναι ευρέως γνωστή και ως Commet Assay (Singh *et al.*, 1988). Η μέθοδος αυτή, εισήχθη τα τελευταία χρόνια και αναγνωρίζει με ένα απλό, γρήγορο και ευαίσθητο τρόπο την ζημιά του DNA στα σπερματοζωάρια (Cabrita *et al.*, 2005). Η τεχνική SCGE, εκτιμά τις σχάσεις στις μονές αλυσίδες του κυτταρικού DNA. Πρόκειται για μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο φθορισμομετρικής μικροσκοπίας, με ένα ασυνήθιστο χαρακτηριστικό, καθώς η βλάβη στο DNA οπτικοποιείται σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων (Ostling & Johanson, 1984).

Η ανάπτυξη της μεθόδου, αποδίδεται προς τιμή στον Singh και τους συνεργάτες του (Singh *et al.*, 1988), αν και πρώτοι οι Ostling και Johanson το 1984, δημοσίευσαν μια παρόμοια μέθοδο για την ανίχνευση βλαβών στο DNA, σε κύτταρα που εκτίθενται σε ιονίζουσα ακτινοβολία. Οι τροποποιήσεις στην μέθοδο, που πρότειναν ο Singh και οι συνεργάτες του το 1988, αποτέλεσαν την βάση για την μετέπειτα εξέλιξή της. Από την πρώτη εμφάνιση της, η μέθοδος έχει υποστεί επιπρόσθετες αλλαγές που αύξησαν σημαντικά την ευαισθησία και την χρησιμότητα της και έτσι με διάφορες τροποποιήσεις, είναι δυνατόν να ανιχνευθούν διαφορετικά είδη βλάβης, όπως είναι οι σχάσεις στις μονόκλωνες ή δίκλωνες αλυσίδες και η οξειδωση των βάσεων του DNA (Barbouti *et al.*, 2002).

Με τις διάφορες παραλλαγές της μεθόδου, εκτιμούνται οι σχάσεις στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA (Barbouti *et al.*, 2001). Επειδή δεν πρόκειται για θραύσματα στις διπλές αλυσίδες του DNA, για να ανιχνευθούν οι σχάσεις αυτές πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση του DNA μεμονωμένων κυττάρων κάτω από ισχυρά αλκαλικές συνθήκες (pH>13). Στις συνθήκες αυτές μετουσιώνεται το DNA, δηλαδή καταστρέφονται οι δεσμοί υδρογόνου και

αποδιατάσσεται το δίκλωνο DNA προς σχηματισμό μονόκλωνων μορίων (Doulias *et al.*, 2001). Η παρουσία σχάσεων στις μονόκλωνες αλυσίδες, επιτρέπει την μετατόπισή του DNA προς την άνοδο κατά την ηλεκτροφόρηση, με αποτέλεσμα να προκύπτουν σχηματισμοί του DNA που μοιάζουν με κομήτες, από το οποίο προκύπτει και το όνομα της τεχνικής (Ostling & Johanson, 1984). Μάλιστα, το ποσοστό του DNA που μετατοπίζεται, είναι ανάλογο με τον αριθμό των σχάσεων στο DNA. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ανιχνεύονται επίσης και οι απουρινικές ή απυριμιδινικές περιοχές (alkali labile sites), οι οποίες σε υψηλό pH μετατρέπονται σε σχάσεις (Singh *et al.*, 1988). Πριν την χρώση και την οπτική παρατήρηση, οι δίκλωνες αλυσίδες του DNA που δεν έχουν μετατοπιστεί κατά την ηλεκτροφόρηση επανασχηματίζονται σε pH 7,5. Έτσι, οι σχηματισμοί που παρατηρούνται στο μικροσκόπιο είναι στην πραγματικότητα «θηλιές» του DNA, που απελευθερώνονται από το υψηλά υπερσυσπειρωμένο πυρηνικό DNA (Barbouti *et al.*, 2001).

3.3.2 Οπτική ανάλυση

Για την οπτική ανάλυση, γίνεται χρώση του DNA και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού (Ostling and Johanson, 1984). Για την εκτίμηση των βλαβών, γίνεται κατηγοριοποίηση σε 5 τάξεις (0, 1, 2, 3 και 4), ανάλογα με την έκταση της βλάβης. Η τάξη 0, αντιστοιχεί στο ανέπαφο DNA που φαίνεται στρογγυλό και φωτεινό. Στην τάξη 1, αντιστοιχεί το DNA που περιέχει ένα μικρό ποσοστό βλάβης και εμφανίζεται στρογγυλό, αλλά πιο διάχυτο από τα νουκλεοτίδια της τάξης 0. Στις τάξεις 2, 3 και 4, η βλάβη στο DNA είναι πιο σημαντική και κατά την ηλεκτροφόρηση ένα μέρος του DNA μετακινείται προς την κάθοδο, σχηματίζοντας «ουρά» (Barbouti *et al.*, 2001).

Το ποσοστό του DNA που μετακινείται προς την κάθοδο είναι μικρότερο για την τάξη 2 και αυξάνει για την τάξη 3 και 4. Η οπτική μέτρηση της βλάβης στο κυτταρικό DNA του κάθε δείγματος, βασίζεται στην τυχαία καταμέτρηση 100 τέτοιων σχηματισμών και στην κατάταξή τους σε μία από αυτές τις 5 τάξεις. Το % ποσοστό σε κάθε τάξη, πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό της τάξης, δηλαδή το ποσοστό των σχηματισμών DNA στην τάξη 0 πολλαπλασιάζεται επί 0, το ποσοστό στην τάξη 1 πολλαπλασιάζεται επί 1



κλπ. Έτσι, το ολικό άθροισμα από 100 σχηματισμούς κυμαίνεται από 0 (όταν το 100% αντιστοιχεί στην τάξη 0), έως 400 (όταν το 100 % των σχηματισμών αντιστοιχεί στην τάξη 4). Με αυτόν τον τρόπο η ολική βλάβη στο DNA του κυτταρικού πληθυσμού, μπορεί να εκφραστεί σε αυθαίρετες μονάδες (Singh *et al.*, 1988).

4. ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΡΥΟΔΙΑΤΗΡΗΜΕΝΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Η μείωση της ικανότητας γονιμοποίησης του κατεψυγμένου-αποψυγμένου σπέρματος, πιθανόν να εκφράζει τις αλλαγές στον δείκτη κινητικότητας, η οποία παρατηρείται μετά την διαδικασία κατάψυξης - απόψυξης. Στο λαβράκι, η συχνότητα κίνησης του μαστίγιου των κολυμβητικών σπερματοζωαρίων, δεν επηρεάστηκε από την διαδικασία της κρυοδιατήρησης, αλλά η ευθεία και καμπυλόγραμμη ταχύτητα κολύμβησης, ήταν σημαντικά μειωμένη. Η ευθύγραμμη ταχύτητα κίνησης των κατεψυγμένων - αποψυγμένων σπερματοζωαρίων του καλκανιού, δεν διαφοροποιήθηκε ουσιαστικά, από το σπέρμα των φρέσκων ψαριών (Suquet *et al.*, 2000).

Η ανάπτυξη των ψαριών που προήλθαν από κατεψυγμένα – αποψυγμένα σπερματοζωάρια, δεν είναι αρκετά εξακριβωμένη. Γονιμοποιώντας ωάρια με κρυοδιατηρημένο σπέρμα, δεν επηρεάζει το ποσοστό εκκόλαψης στον μπακαλιάρο. Επιπλέον, η μορφολογία των προνυμφών που προήλθαν από αποψυγμένα σπερματοζωάρια, είναι παρόμοια με αυτά που προήλθαν από νωπό σπέρμα (Suquet *et al.*, 2000).

Στο *Limanda ferruginea* (Storer, 1839), το ποσοστό εκκόλαψης και το ποσοστό των δύσμορφων προνυμφών, δεν επηρεάστηκε από την διαδικασία κρυοδιατήρησης και ακόμη και 29 ημερών προνύμφες του *Lates calcarifer*, που προήλθαν από κατεψυγμένα – αποψυγμένα σπερματοζωάρια, δεν εμφάνισαν δυσμορφίες. Το ποσοστό εκκόλαψης, το ποσοστό επιβίωσης των λαρβών και το βάρος, λαρβών 10 ημερών του καλκανιού, δεν ήταν σημαντικά διαφορετικά, όταν τα ωάρια γονιμοποιήθηκαν με φρέσκα, σε σύγκριση με κατεψυγμένα – αποψυγμένα σπερματοζωάρια. Παρόλα αυτά, το ποσοστό

εκκόλαψης των ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν με κατεψυγμένο – αποψυγμένο σπέρμα λαβρακιού, είναι σημαντικά χαμηλότερα από αυτό των αυγών που γονιμοποιήθηκαν με νωπό σπέρμα (Suquet *et al.*, 2000).

Ο Drokin (1993), ισχυρίστηκε ότι τα καλύτερα αποτελέσματα της κρυοδιατήρησης σπερματοζωαρίων θαλασσινών ψαριών, μπορεί να οφείλονται στην σύνθεση των λιπιδίων της μεμβράνης του σπέρματος, κυρίως στο ποσοστό της χοληστερόλης σε φωσφολιπίδια, το οποίο είναι 2-3 φορές υψηλότερο, από αυτό στα ψάρια του γλυκού νερού.

Η διαδικασία της κρυοδιατήρησης, περιορίζει την μείωση του ενδοκυτταρικού ATP στα σπερματοζωάρια του καλκανιού, στα 20-40% . Αυτή η μείωση είναι χαμηλότερη από ότι στην ιριδίζουσα πέστροφα (50 - 90%), και παρόμοια με αυτή στο γατόψαρο. Αυτή η χαμηλή κατανάλωση ATP, μπορεί να εξηγήσει το υψηλότερο ποσοστό κινητικότητας που παρουσιάζεται στα κατεψυγμένα – αποψυγμένα σπερματοζωάρια του καλκανιού (70%) και του γατόψαρου (60%), συγκρινόμενα με αυτά της πέστροφας (21%). Επιπλέον, η σημαντική μείωση της κρυοαντοχής των σπερματοζωαρίων του λαβρακιού, που φανερώνεται στο τέλος της αναπαραγωγής περιόδου των αρσενικών, μπορεί να εξηγηθεί από την μείωση του ενδογενούς ATP. Αντίθετα, το περιεχόμενο της ATP, μειώνεται ελάχιστα στα σπερματοζωάρια του *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), κατά τη διάρκεια της κρυοδιατήρησης. Παρόλα αυτά, μόνο το 22% των κατεψυγμένων - αποψυγμένων σπερματοζωαρίων αυτού του είδους, μπορεί να ενεργοποιηθεί. Πριν την κίνηση, το περιεχόμενο ATP στα κατεψυγμένα -αποψυγμένα σπερματοζωάρια της πέστροφας είναι περίπου $1,85 \times 10^{-2} \text{ mmole } 10^{-9}$ σπερματοζωάρια. Όταν υπολογίζουμε τον εσωτερικό όγκο των κυττάρων σε $0,16 \mu\text{l } 10^{-7}$ σπερματοζωάρια, αυτό οδηγεί σε μια συγκέντρωση 1.2 mmole l^{-1} . Σύμφωνα με μελέτες, τα σπερματοζωάρια της ιριδίζουσας πέστροφας, κινούνται σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση ATP ($0,2 \text{ mmole l}^{-1}$). Συνεπώς, η μικρότερη απώλεια της ενδοκυτταρικής ATP, δεν μπορεί να εξηγήσει την υψηλότερη επιβίωση των κατεψυγμένων - αποψυγμένων σπερματοζωαρίων του καλκανιού, συγκρινόμενη με τα σπερματοζωάρια της ιριδίζουσας πέστροφας (Suquet *et al.*, 2000).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΨΑΡΙΩΝ ΚΑΙ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα, ήταν δύο ειδών, λούτσοι και κέφαλοι και συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 12 ώριμα αρσενικά ψάρια. Αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκαν αρχικά, 4 ώριμοι αρσενικοί λούτσοι οι οποίοι αλιεύτηκαν στην περιοχή του Αμβρακικού κόλπου, τις πρώτες πρωινές ώρες, στις 10/5/2007 (Εικόνα 7). Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν 8 ώριμοι αρσενικοί κέφαλοι, οι οποίοι επίσης αλιεύτηκαν τις πρώτες πρωινές ώρες, στις 16/10/2007, 24/10/2007 και 30/10/2007 (Εικόνα 8).

Η φυσική αναπαραγωγική περίοδος αυτών των ψαριών για την περιοχή του Αμβρακικού είναι για τους κεφάλους από Αύγουστο έως Οκτώβριο, ενώ για τους λούτσους από Ιούνιο έως Αύγουστο.

Τα πειράματα διενεργήθηκαν στο εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών και Εσωτερικών Υδάτων και στο εργαστήριο Οικοφυσιολογίας Ιχθύων του Τμήματος Ιχθυοκομίας - Αλιείας του ΤΕΙ Ηπείρου στην Ηγουμενίτσα.



Εικ. 7 Δείγματα *Sphygaena sphygaena* που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα

Τα ψάρια αποκτήθηκαν από αλιείς της περιοχής και υπολογίζεται ότι από την στιγμή της αλίευσης και θανάτωσής τους, έως την στιγμή που πραγματοποιήθηκε το πείραμα, είχε παρέλθει χρονικό διάστημα, περίπου 6-7 ωρών. Σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από την συλλογή ψαριών κατά τις 30/10/2007, τα ψάρια παρέμειναν στο ψυγείο για 3 - 4 ώρες (4° C), και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στα εργαστήρια του ΤΕΙ Ηπείρου στην Ηγουμενίτσα, σε κουτιά από φελιζόλ που περιείχαν παγοκυψέλες.

Για τους κέφαλους που αλιεύτηκαν στις 30/10/2007, το σπέρμα των ψαριών συλλέχθηκε, με άσκηση κοιλιακής πίεσης, άμεσα στο αλιευτικό πεδίο. Το σπέρμα αναμίχθηκε σε ένα αποστειρωμένο πλαστικό δοχείο και έγινε μεταφορά του στα εργαστήρια στην Ηγουμενίτσα, σε κουτιά που περιείχαν παγοκυψέλες, για την διεξαγωγή του πειράματος. Στα ψάρια αυτά δεν έγινε καμία άλλη μέτρηση, ούτε ζύγισμα για την εύρεση του βάρους του, καθώς μόνο το σπέρμα τους μεταφέρθηκε στα εργαστήρια. Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκε το σπέρμα από 4 κέφαλους.



Εικ. 8 Δείγματα *Mugil cephalus* που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα

Οι λούτσοι ζυγίστηκαν και βρέθηκε ότι ζύγισαν 99.4 g, 82.7 g, 74.6 g και 197.1 g. Οι κέφαλοι, εκτός από αυτούς που δεν μεταφέρθηκαν στο

εργαστήριο, επίσης, ζυγίστηκαν πριν αρχίσει το πείραμα και βρέθηκε ότι ήταν 722.4 g, 701.5 g, 785.8 g και 827.1 g.

Για την συλλογή του σπέρματος, αρχικά έγινε προσπάθεια με την άσκηση κοιλιακής πίεσης να προκληθεί η εξαγωγή του σπέρματος. Πριν την συλλογή του σπέρματος, το αρσενικό στεγνώθηκε, σκουπίζοντας το προσεκτικά με μια πετσέτα, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στην κοιλιακή χώρα. Αυτό έγινε, καθώς είναι γνωστό ότι το νερό ενεργοποιεί το σπέρμα και επομένως είναι σημαντικό να στεγνώσει εντελώς η περιοχή γύρω από τον γεννητικό πόρο, για να αποφευχθεί η πρόωρη ενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων και η εξασθένηση τους, πολύ πριν ολοκληρωθεί το πείραμα. Για την αποβολή του σπέρματος, ασκήθηκε ήπια πίεση στις πλευρές του ψαριού, ενώ ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην αποφυγή αποβολής περιττωμάτων ή αίματος, τα οποία μπορεί να εξέρχονται μαζί με το σπέρμα και να προκαλέσουν την επιμόλυνση του.

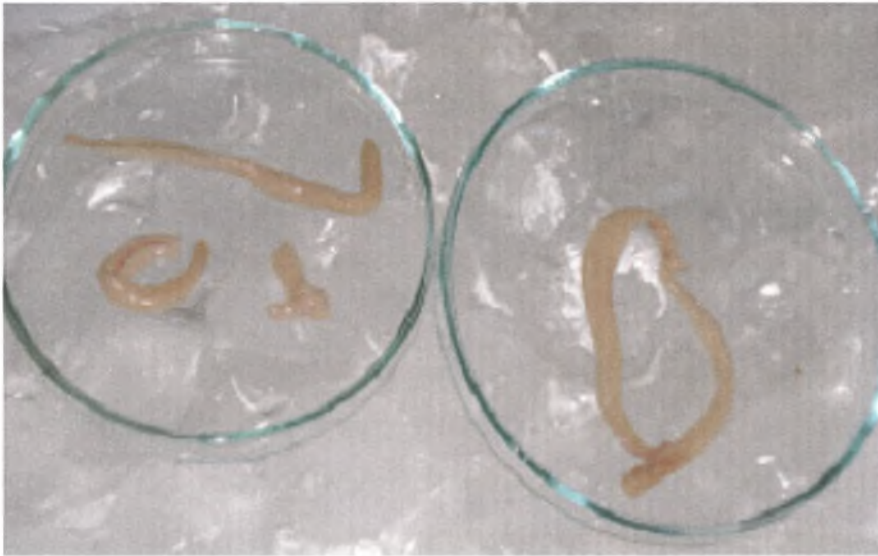
Στα ψάρια που με αυτή την τεχνική δεν ήταν δυνατή η συλλογή του σπέρματος, λόγω της πυκνότητας του σπερματικού υγρού, το σπέρμα συλλέχθηκε, μετά την αφαίρεση των αναπαραγωγικών αδένων, για τον υπολογισμό του γοναδικού δείκτη. Το σπέρμα από κάθε άτομο τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένα και στεγνά τριβλία (Εικόνα 9) και από τη στιγμή της συλλογής του μέχρι την διεξαγωγή του πειράματος, φυλάχθηκε σε ψυγείο, σε θερμοκρασία 4° C ή σε κουτί από φελιζόλ, στο οποίο υπήρχαν παγοκυψέλες.



Εικ. 9 Δοχεία αποθήκευσης σπέρματος

2. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΓΟΝΑΔΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ

Με τη χρήση ενός νυστεριού και ενός ψαλιδιού, τα ψάρια ανοίχτηκαν στην κοιλιακή χώρα και προσεκτικά αφαιρέθησαν οι αναπαραγωγικοί αδένες (Εικόνες 10, 11)., οι οποίοι ζυγίστηκαν. Ο λόγος, (βάρος αναπαραγωγικών αδένων / ολικό βάρος ψαριού)Χ100, δίνει τον γοναδικό δείκτη, ο οποίος παρέχει πληροφορίες σχετικά με τον βαθμό ωριμότητας των αρσενικών, στη διάρκεια της αναπαραγωγικής τους περιόδου.



Εικ. 10 Αναπαραγωγικοί αδένες αρσενικών *Sphygaena sphygaena*



Εικ. 11 Αναπαραγωγικοί αδένες αρσενικών *Mugil Cephalus*

3. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Αρχικά, για την διασφάλιση της απουσίας επιμολύνσεων ούρων ή νερού, ποσότητα σπέρματος τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα και παρατηρήθηκε κάτω από οπτικό μικροσκόπιο (OLYMPUS CX 41), ώστε να πιστοποιηθεί ότι αυτό βρίσκεται σε μη κινητική κατάσταση.

Για την εκτίμηση της κινητικότητας, μια πολύ μικρή ποσότητα σπέρματος λήφθηκε με μια μικροπιπέτα, είτε από το πλαστικό δοχείο όπου είχε αποθηκευτεί, είτε απευθείας από τους αναπαραγωγικούς αδένες των αρσενικών, και τοποθετήθηκε σε ένα φιαλίδιο κρυοδιατήρησης, όπου αραιώθηκε με το πρώτο διάλυμα ακινητοποίησης (CryoFish -imv.France) (1η αραιώση) σε ποσοστό 1:100 (σπέρμα : διάλυμα).

Στη συνέχεια, μια μικρή ποσότητα του αραιωμένου σπέρματος, περίπου 5μl, τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα και καλύφθηκε με καλυπτρίδα 2 x 2 cm.

Για την εκτίμηση της κινητικότητας, η αντικειμενοφόρος τοποθετήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο και έγινε εστίαση στο τμήμα της αντικειμενοφόρου, από όπου έγινε εισαγωγή του διαλύματος ενεργοποίησης, σε μεγέθυνση X400. Για την ενεργοποίηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων στο σπέρμα, έγινε μια δεύτερη αραιώση, σε αναλογία 1: 20 με διάλυμα κινητοποίησης, η οποία αραιώση έγινε κατευθείαν κάτω από το μικροσκόπιο.

Το πείραμα, επίσης, πραγματοποιήθηκε με μη αραιωμένο σπέρμα. Σε αυτή την περίπτωση η συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων στο οπτικό μικροσκόπιο είναι πολύ μεγάλη και η έναρξη της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων γίνεται σταδιακά, καθώς το διάλυμα ενεργοποίησης δεν έρχεται σε επαφή ταυτόχρονα, με τον ολικό όγκο των σπερματοζωαρίων.

Στην παρούσα εργασία, ως διάλυμα ενεργοποίησης, χρησιμοποιήθηκε θαλασσινό νερό, αλατότητας 33‰, ενώ η σύνθεση του διαλύματος 1^{ης} αραιώσης φαίνεται στον πίνακα 2 που ακολουθεί, ενώ στον πίνακα 3 φαίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του αντιδραστηρίου ακινητοποίησης του σπέρματος.

Πιν. 2 Σύνθεση διαλύματος ακινητοποίησης

Αντιδραστήρια	Διάλυμα 1 ^{ης} αραιώσης – ακινητοποίησης σπέρματος
NaCl	80mM
KCl	40mM
CaCl ₂	0.1mM
Tris-HCl (pH 9.2)	30mM

Πιν. 3 Υπολογισμός συγκέντρωσης αντιδραστηρίου ακινητοποίησης

	<u>Συγκέντρωση</u> (moles)	<u>Μοριακό</u> <u>βάρος</u>	<u>Γραμμάρια</u> σε 1000ml
NaCl	0.08	58.44	4.675
KCl	0.04	74.56	2.982
CaCl ₂	0.0001	110.99	0.011
Tris-HCl (pH 9.2)	0.03	157.6	4.728

4. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΡΙΘΜΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Για την καταμέτρηση των σπερματοζωαρίων, αρχικά έγινε αραιώση του σπέρματος με φυσιολογικό ορό, σε αναλογία 1 : 1000. Με μια μικροπιπέτα, λήφθηκε 100 µl σπέρματος και στην συνέχεια 100 ml φυσιολογικός ορός και τοποθετήθηκαν σε ένα γυάλινο φιαλίδιο, όπου και έγινε ήπια ανάδευση τους. Μια μικρή ποσότητα αραιωμένου σπέρματος τοποθετήθηκε σε μια πλάκα Neubauer και έγινε εστίαση σε μικροσκόπιο, στο τμήμα της πλάκας όπου υπάρχουν τα ειδικά τετραγωνίδια για την μέτρηση των σπερματοζωαρίων. Στη συνέχεια, μετρήθηκε ο αριθμός των σπερματοζωαρίων που υπήρχαν σε ένα συγκεκριμένο αριθμό τετραγωνιδίων της πλάκας Neubauer και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των σπερματοζωαρίων ανά τετραγωνάκι, κάνοντας τις κατάλληλες αναγωγές με βάση τον τύπο

$$X = \frac{n_1 + n_2 + n_3 + \dots + n_x}{n}$$

όπου n = αριθμός τετραγωνιδίων που μετρήθηκαν.

Το κάθε τετράγωνο της πλάκας Neubauer, αλλά και τα υποπολλαπλάσια αυτών τετραγωνίδια, στα οποία μετρήθηκαν τα σπερματοζωάρια, είναι γνωστού εμβαδού. Επομένως, αφού έγινε υπολογισμός του αριθμού των σπερματοζωαρίων στα τετραγωνίδια, αλλά και το εμβαδό του συνόλου αυτών, είναι δυνατός ο υπολογισμός του λόγου αριθμός κυττάρων / mm³, ο οποίος αφού πολλαπλασιάστηκε με τον συντελεστή αραιώσης των σπερματοζωαρίων, παρείχε την πυκνότητα των σπερματοζωαρίων ανά ml.

5. ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΣΕ ΨΥΚΤΙΚΟ ΘΑΛΑΜΟ (4° C)

1° Πείραμα

Το πείραμα της διατήρησης του σπέρματος σε χαμηλή θερμοκρασία (4° C), διεξήχθη για τον κέφαλο.

Χρησιμοποιήθηκε το σπέρμα του ψαριού, το οποίο παρουσίασε τα καλύτερα χαρακτηριστικά κατά την διαδικασία εκτίμησης της ποιότητας του και έτσι, χρησιμοποιήθηκε το σπέρμα του τρίτου ψαριού κέφαλου (βάρους 785.8 g), το οποίο εμφάνισε το μεγαλύτερο ποσοστό κινητικών σπερματοζωαρίων, την πιο έντονη και γρήγορη ταχύτητα κολύμβησης, καθώς και μεγάλη διάρκεια κινητικότητας. Το σπέρμα αυτού του ψαριού, παρέμεινε σε ψυκτικό θάλαμο για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, είτε αφού αραιώθηκε με διάφορα διαλύματα, είτε μη αραιωμένο, και κατά διαστήματα ελέγχονταν η βιωσιμότητα του, ώστε να βρεθεί η επίδραση των κρυοπροστατευτικών διαλυμάτων στην βραχυπρόθεσμη διατήρηση του σπέρματος αυτού του είδους ψαριού (1° πείραμα).

Για την κρυοσυντήρηση του σπέρματος, ποσότητα σπέρματος λήφθηκε από το ψάρι με άσκηση κοιλιακής πίεσης και τοποθετήθηκε σε φιαλίδια κρυοδιατήρησης, όπου έγινε η αραιώση του με ποσότητα των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν. σε αναλογία 1:3 (σπέρμα:διάλυμα, v:v).

Τα κρυοπροστατευτικά διαλύματα (κρυοπροστατευτικές ουσίες σε διάλυμα ακινητοποίησης σε αναλογία 1 : 10, κρυοπροστατευτική ουσία : διάλυμα ακινητοποίησης, ν:ν) που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα ήταν διάλυμα 10% DMSO και 10% Egg Yolk, 10% Methanol, καθώς και 10% Ethylene Glycol, ενώ χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ακινητοποίησης (CryoFish-*imn.France*). Στο εξωτερικό μέρος των φιαλιδίων, σημειώθηκε με μαρκαδόρο το κρυοπροστατευτικό που χρησιμοποιήθηκε. Επίσης, το πείραμα διεξήχθη και με μη αραιωμένο σπέρμα, το οποίο λαμβάνονταν κάθε φορά, απευθείας, από τους αναπαραγωγικούς αδένες των αρσενικών.

Για τον υπολογισμό της βραχυπρόθεσμης διατήρησης του σπέρματος και την εκτίμηση της επίδρασης των διάφορων κρυοπροστατευτικών και του διαλύματος ακινητοποίησης, το σπέρμα, είτε αναμεμιγμένο με κάποιο από τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, είτε μη αραιωμένο, ευρισκόμενο στους αναπαραγωγικούς αδένες του ψαριού, διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 4° C. Έτσι, τα φιαλίδια κρυοδιατήρησης που περιείχαν το αραιωμένο με τα διάφορα διαλύματα σπέρμα και το πλαστικό δοχείο που περιείχε τους αναπαραγωγικούς αδένες, αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο.

Για την εκτίμηση της επιτυχίας της κρυοσυντήρησης του σπέρματος, λήφθηκε ποσότητα είτε αραιωμένου σπέρματος, από το κάθε φιαλίδιο κρυοδιατήρησης, είτε μη αραιωμένο από τους αναπαραγωγικούς αδένες των αρσενικών και τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα κάτω από οπτικό μικροσκόπιο, για την εξακρίβωση της έναρξης της κινητικότητας και τη διάρκεια αυτής, με την προσθήκη διαλύματος ενεργοποίησης (θαλασσινό νερό αλατότητας 33‰).

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε, σε χρονικά διαστήματα 30 λεπτά μετά την έναρξη του, 60 λεπτά, 150 λεπτά, 240 λεπτά, 360 λεπτά, 24 ώρες, 30 ώρες, 5 ημέρες και 7 ημέρες.

2° Πείραμα

Το πείραμα της διατήρησης του σπέρματος σε ψυκτικό θάλαμο, πραγματοποιήθηκε και με το σπέρμα, το οποίο μεταφέρθηκε στο εργαστήριο αφότου είχε ληφθεί στο πεδίο από τους αναπαραγωγικούς αδένες των αρσενικών, και έγινε έλεγχος της επίδρασης της τοξικότητας του κρυοπροστατευτικού παράγοντα, στην βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων

(2^ο πείραμα). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με την προηγούμενη. Σε αυτό το πείραμα, το σπέρμα αραιώθηκε με διάλυμα ακινητοποίησης και με κρυοπροστατευτικό διάλυμα 10% DMSO και 10% Egg Yolk, σε αναλογία 1:3 (σπέρμα:διάλυμα, v:v) και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που αναφέρθηκε προηγουμένως. Τέλος, έγινε έλεγχος της κινητικότητας του σε χρονικά διαστήματα 1 ώρας μετά την διατήρηση του σπέρματος στον ψυκτικό θάλαμο, 3 ώρες, 12 ώρες, 24 ώρες, 48 ώρες, 72 ώρες και 96 ώρες μετά.

6. ΚΡΥΟΔΙΑΤΗΡΗΣΗ

6.1 Σχηματισμός κρυοπροστατευτικών διαλυμάτων

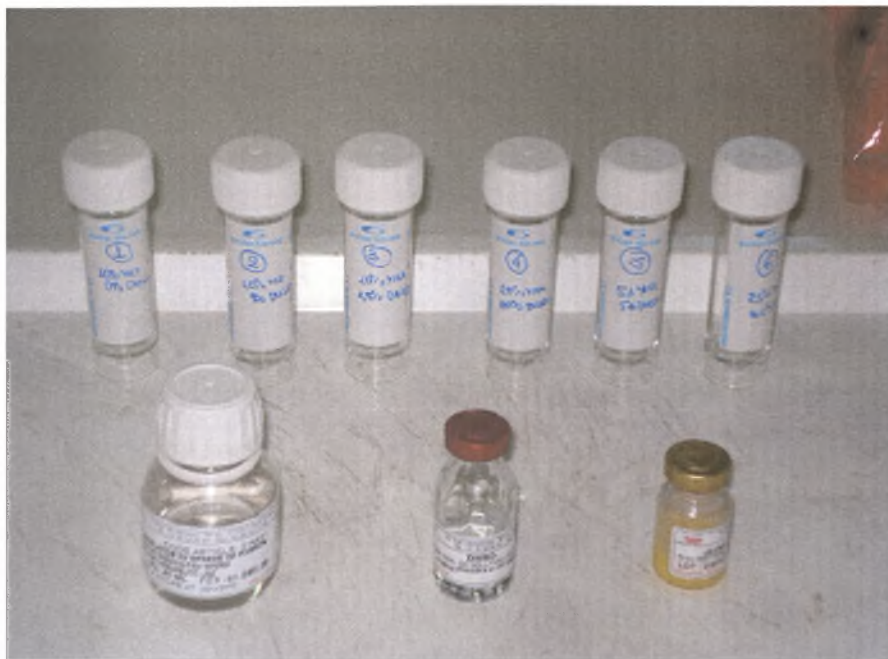
Τα κρυοπροστατευτικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, αραιώθηκαν σε διάλυμα ακινητοποίησης, ώστε να προκληθεί έτσι κρυοπροστατευτικό διάλυμα επιθυμητής συγκέντρωσης. Είναι γνωστό ότι τα διαλύματα ακινητοποίησης, έχουν τέτοια συγκέντρωση ιόντων, ώστε να διατηρούν το σπέρμα σε μία μη κινητική κατάσταση. Επίσης, αυτά τα διαλύματα, σταθεροποιούν τις φυσικοχημικές παραμέτρους, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και για αυτό, παρατείνουν την ζωή των σπερματοζωαρίων σε διατήρηση και ονομάζονται διαλύματα αραιώσης σπέρματος (extenders). Σε αυτό το πείραμα, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ακινητοποίησης CryoFish-*imv.France*.

6.1.1 Κρυοπροστατευτικά διαλύματα για το σπέρμα του

Sphingoaena sphingoaena

Το κρυοπροστατευτικό διάλυμα που περιέχει διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και λέκιθο αυγού κότας (Egg Yolk), είναι ευρέως χρησιμοποιούμενο και πολλοί συγγραφείς έχουν αναφερθεί στη χρήση και τα αποτελέσματα του (Harvey, 1983; Dreanno *et al.* 1997; Horváth & Urbányi, 2000; Chereguini *et al.*, 2003; Horvath *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006; Maria *et al.*, 2006).

Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται πιο συχνά, σε αυτά τα διαλύματα είναι 10% λέκιθο αυγού και 10% DMSO (Harvey, 1983; Maria et al, 2006), και σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε κρυοπροστατευτικό διάλυμα αυτής της συγκέντρωσης, αλλά και 5 άλλα διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης (Εικόνα 12) σε DMSO και λέκιθο αυγού (σε αναλογία 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, κρυοπροστατευτική ουσία:διάλυμα ακινητοποίησης, ν:ν).



Εικ. 12 Κρυοπροστατευτικά διαλύματα για την κρυοδιατήρηση του σπέρματος των λούτσων

Στη συνέχεια, έγινε κρυοδιατήρηση του σπέρματος με αυτά τα 6 κρυοπροστατευτικά διαλύματα, ώστε με τον έλεγχο της ποιότητας του αποψυγμένου σπέρματος, να εξακριβωθεί η καταλληλότητα αυτών των κρυοπροστατευτικών διαλυμάτων, για την κρυοδιατήρηση του σπέρματος λούτσων.

Οι συγκεντρώσεις των 6 διαφορετικών διαλυμάτων φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί (Πιν. 4).

Πιν. 4 Συγκεντρώσεις κρυοπροστατευτικών διαλυμάτων για την κρυοδιατήρηση του σπέρματος των λούτσων.

Διάλυμα	Ρυθμιστικό διάλυμα Buffer (ml)	Λέκιθος αυγού (ml)	DMSO(ml)	Συγκεντρώσεις
1	4.50	0.50	0.00	10% Yolk, 0% DMSO
2	4.375	0.50	0.125	10% Yolk, 5 % DMSO
3	4.25	0.50	0.25	10% Yolk, 2.5% DMSO
4	4.00	0.50	0.50	10% Yolk, 10% DMSO
5	4.50	0.25	0.25	5 % Yolk, 5 % DMSO
6	4.75	0.125	0.125	2.5% Yolk, 2.5% DMSO

6.1.2 Κρυοπροστατευτικά διαλυμάτα για το σπέρμα του *Mugil cephalus*

Τα κρυοπροστατευτικά διαλύματα (κρυοπροστατευτικές ουσίες σε διάλυμα ακινητοποίησης σε αναλογία 1 : 10, κρυοπροστατευτική ουσία:διάλυμα ακινητοποίησης, ν:ν) που χρησιμοποιήθηκαν για την κρυοδιατήρηση του σπέρματος των ψαριών *Mugil cephalus*, ήταν διάλυμα 10% μεθανόλης (Methanol), διάλυμα 10% αιθυλενογλυκόλης (Ethylene Glycol) και διάλυμα που περιείχε 10% DMSO και 10% λέκιθο αυγού. Αυτά τα κρυοπροστατευτικά διαλύματα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την διατήρηση πολλών θαλασσινών, αλλά και ψαριών εσωτερικών υδάτων (Aoki *et al*, 1997; Horváth & Urbányi, 2000; Suquet *et al*, 2000; Horváth *et al*, 2003; Ji *et al*, 2004; Melo & Godinho, 2006). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα ακινητοποίησης (CryoFish-Inv.France), που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της κινητικότητας του σπέρματος των λούτσων (Πιν. 2).

6.2 Προετοιμασία σπέρματος για ψύξη και κατάψυξη

Για τους λούτσους, έγινε ανάμιξη του σπέρματος των αρσενικών, χρησιμοποιώντας, όσο ήταν δυνατό, ίση ποσότητα σπέρματος από το κάθε αρσενικό και δημιουργήθηκε κατά αυτόν τον τρόπο μια «δεξαμενή» σπέρματος.

Η κρυοδιατήρηση του σπέρματος των κεφάλων, έγινε αρχικά με το σπέρμα των δύο πρώτων ψαριών στις 16/10/2007 (1^ο πείραμα) και επαναλήφθηκε στις 24/10/2007 (2^ο πείραμα), με το σπέρμα των άλλων ψαριών που ήταν διαθέσιμα, ώστε τα αποτελέσματα που εμφανίστηκαν, να είναι πιο ασφαλή. Το σπέρμα των ψαριών συλλέχθηκε, με άσκηση πίεσης στην κοιλιακή τους χώρα, σε ένα αποστειρωμένο πλαστικό δοχείο, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, όπου έγινε και η ανάμιξη του σπέρματος των δύο ψαριών.

Το κρυοπροστατευτικό διάλυμα και τα δείγματα σπέρματος (το σπέρμα για 5 min), τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ψύξης (σε θερμοκρασία 4°C).

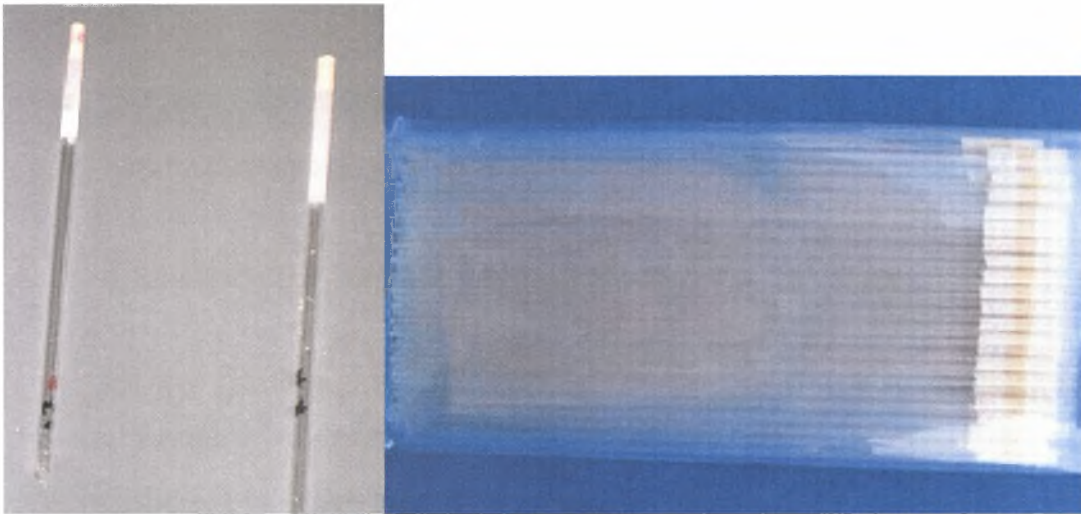
Με μια μικροπιπέτα λήφθηκε μια μικρή ποσότητα του σπέρματος των αρσενικών και τοποθετήθηκε σε φιαλίδια κρυοδιατήρησης και στη συνέχεια έγινε ανάμιξη σπέρματος και κρυοπροστατευτικού διαλύματος, το οποίο περιείχε διάλυμα ακινητοποίησης σπέρματος και κρύο-προστατευτικές ουσίες, σε αναλογία 1:3 (σπέρμα:διάλυμα, v:v) (Εικόνα 13). Κατά την ανάμιξη του σπέρματος με την κρυοπροστατευτική ουσία, δόθηκε προσοχή στο να μην εισαχθούν φυσαλίδες στο διάλυμα.

Το κάθε κρυοπροστατευτικό διάλυμα, τοποθετήθηκε σε διαφορετικό φυαλίδιο κρυοδιατήρησης και στο εξωτερικό τους, σημειώθηκε η συγκέντρωση και το είδος του κρυοπροστατευτικού που προστέθηκε.



Εικ. 13 Ανάμιξη σπέρματος και κρυοπροστατευτικού διαλύματος

Στη συνέχεια, από το κάθε φιαλίδιο κρυοδιατήρησης, με μια μικροπιπέτα λήφθηκε ποσότητα του αραιωμένου σπέρματος και τοποθετήθηκε σε πλαστικά "καλαμάκια" κατάψυξης σπέρματος (μήκος 12 cm, χωρητικότητα 0,5 ml, Cryo Biosystem, France) (Εικόνα 14). Όπως και με τα φιαλίδια κρυοδιατήρησης, στο κάθε καλαμάκι, καταγράφηκε με μόνιμο μαρκαδόρο, το κρυοπροστατευτικό που έχει χρησιμοποιηθεί, έτσι ώστε να είναι δυνατός ο διαχωρισμός του κάθε διαλύματος, μετά την απόψυξη.

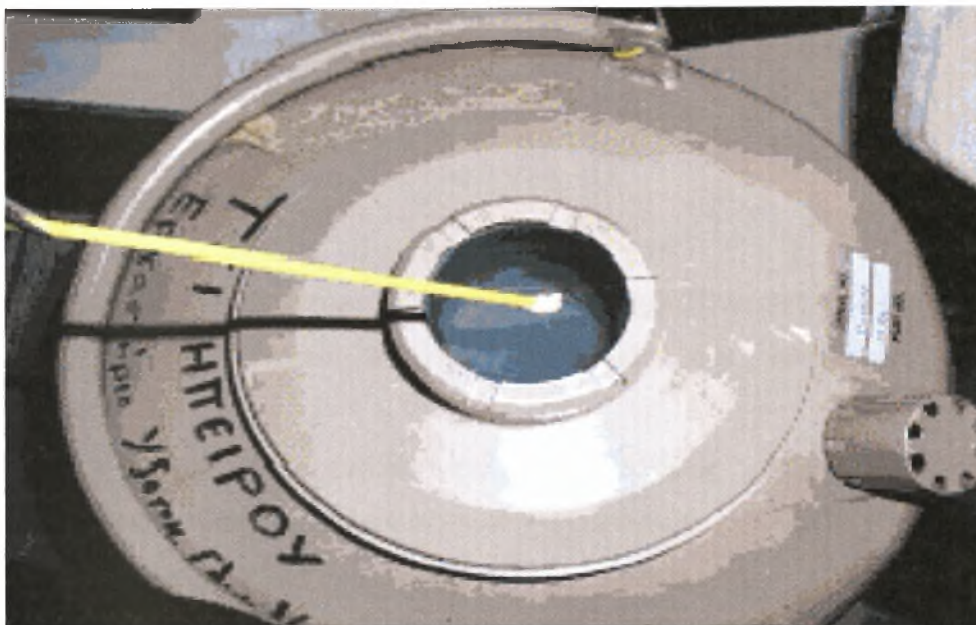


Εικ. 14 Καλαμάκια κρυοδιατήρησης σπέρματος

6.3 Διαδικασία κατάψυξης σπέρματος

Το ένα άκρο των "καλαμακιών" σφραγίστηκε, τοποθετώντας το σε ειδική γόμωση, καθώς το άλλο άκρο σφραγίζει αυτόματα, όταν έρθει σε επαφή με το σπέρμα. Το κάθε "καλαμάκι" τοποθετήθηκε σε πάγο, έως να ολοκληρωθεί η διαδικασία και δεν δόθηκε περαιτέρω χρόνος εξισορρόπησης, παρά μόνο αυτός που μεσολαβεί έως το γέμισμα όλων των καλαμακιών.

Τα "καλαμάκια" τοποθετήθηκαν στο ψυγείο σε θερμοκρασία -70°C , για περίπου 8 min και στη συνέχεια απομακρύνθηκαν από το ψυγείο και τοποθετήθηκαν για ένα μικρό χρονικό διάστημα στους ατμούς του υγρού αζώτου. Στη συνέχεια βυθίστηκαν μέσα στο δοχείο κρυοδιατήρησης σπέρματος που περιέχει υγρό αζώτο (Εικόνα 15), όπου και κρυοδιατηρήθηκαν.



Εικ. 15 Δοχεία υγρού αζώτου και κρυοδιατήρησης σπέρματος

6.4 Απόψυξη σπέρματος

Με την χρήση πλαστικής λαβίδας, τα "καλαμάκια" (με το κατεψυγμένο σπέρμα) αφαιρέθηκαν από το υγρό άζωτο (Εικόνα 16) και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο, με θερμοκρασία 30°C για 10 sec. Τα δύο άκρα των "καλαμακιών" κόπηκαν και το σπέρμα άδειασε σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα και καλύφθηκε με καλυπτρίδα 2 x 2 cm.

Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε κάτω από ένα οπτικό μικροσκόπιο, έγινε εστίαση με φακό X400 και προστέθηκε το διάλυμα ενεργοποίησης (θαλασσινό νερό, αλατότητας 33%).



Εικ. 16 Αφαίρεση σπέρματος από το δοχείο υγρού αζώτου

7. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΑΠΟΨΥΓΜΕΝΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

7.1 Commet Assay

Το πείραμα της Commet Assay πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, της Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων.

Το πείραμα του εντοπισμού της βλάβης στο DNA των σπερματοζωαρίων, μετά από έκθεση των κυττάρων σε H₂O₂ (Cabrita *et al.*, 2005), πραγματοποιήθηκε στο αποψυγμένο σπέρμα των λούτσων που κρυοδιατηρήθηκε με κρυοπροστατευτικά διαλύματα, διαφορετικής συγκέντρωσης σε DMSO και Egg Yolk και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν παρόμοιο με αυτό που έχει περιγραφεί από τους Singh *et al.* (1988).

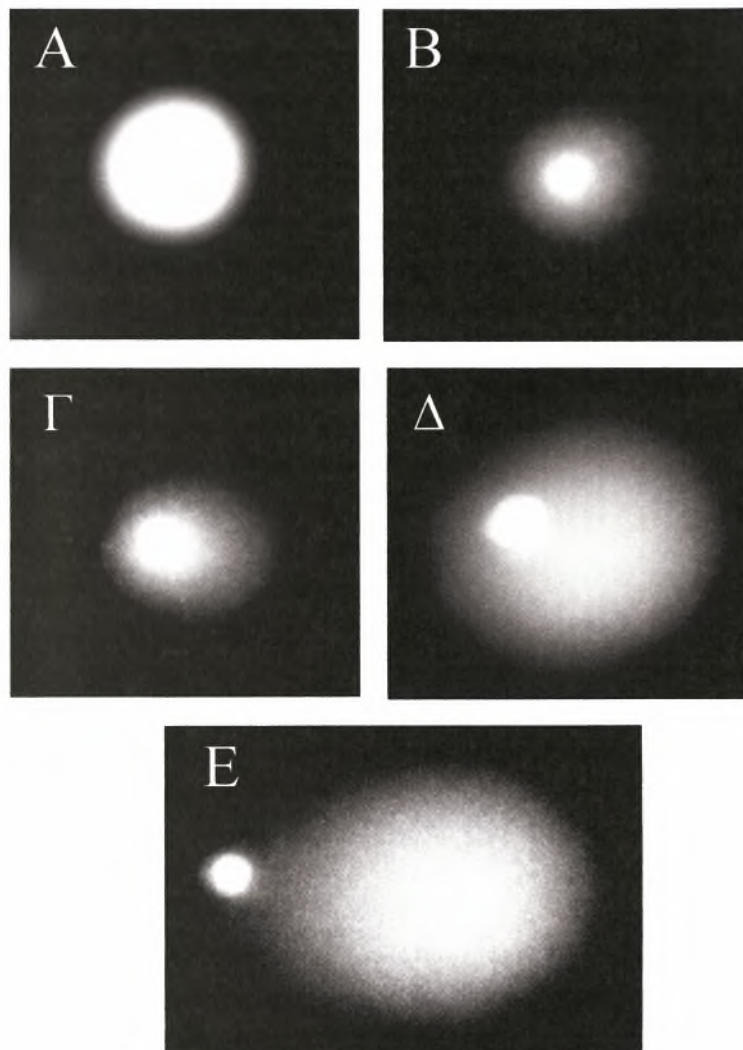
Τα "καλαμάκια", αφού αφαιρέθηκαν από τα δοχεία αποθήκευσης υγρού αζώτου, τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30° C, για χρονικό διάστημα 20 δευτερολέπτων. Το σπέρμα μεταφέρθηκε σε αριθμημένο δοκιμαστικό σωλήνα, αραιώθηκε με PBS σε αναλογία 1 : 10000 (όγκος σπέρματος : όγκος PBS, v:v) και μετρήθηκε ο αριθμός των σπερματοζωαρίων σε αιματοκυτταρόμετρο Neubauer. Ακολουθώντας, μια ποσότητα η οποία περιείχε $1,5 \times 10^5$ σπερματοζωάρια, μεταφέρθηκε σε erppendorf, έγινε φυγοκέντρωση στα 500 g, για 5 min (Centrifuge 5415 D, erppendorf) και το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε.

Τα σπερματοζωάρια επαναδιαλύθηκαν σε 100 μl διαλύματος αγαρόζης χαμηλού σημείου πήξης, συγκέντρωσης 1% σε PBS, η οποία είχε προεπωαστεί στους 37°C. Το παραπάνω κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρους πλάκες μικροσκοπίου που είχαν επιστρωθεί με 1% αγαρόζη φυσιολογικού σημείου πήξεως σε PBS. Πάνω από αυτό τοποθετήθηκε μια καλυπτρίδα 2 x 2 cm και οι αντικειμενοφόρες πλάκες μεταφέρθηκαν στους 4°C, ώστε να πήξει η αγαρόζη και τα κύτταρα να παγιδευτούν μέσα στο στρώμα της πηκτής. Ακολουθώντας, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίστηκαν για 1 ώρα σε ψυχρό διάλυμα λύσης (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10, 1% Triton X-100 v/v) στους 4°C. Η λύση κάτω από αυτές τις συνθήκες απομακρύνει μεγάλο μέρος από τα κυτταρικά

συστατικά, αλλά το DNA παραμένει υπερελικομένο και πακεταρισμένο σε μια πυρηνοειδή δομή (nucleus-like structure).

Εν συνεχεία, οι αντικειμενοφόρες πλάκες μεταφέρθηκαν σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης 30 εκατοστών που περιείχε ψυχρό αλκαλικό διάλυμα (0,3 M NaOH και 1 mM EDTA) για 40 λεπτά στους 4°C. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στο ίδιο διάλυμα, στα 30 Volts και στα 300 mAmps για 30 min στους 4°C. Τέλος, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίστηκαν τρεις φορές από 5 λεπτά σε ψυχρό διάλυμα ουδετεροποίησης (0,4 M Tris, pH 7,5). Για την οπτική ανάλυση, πραγματοποιήθηκε χρώση του DNA με 35 μM Hoechst 33342 για 10 λεπτά και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού (Axiovert S 100, Zeitz) κάτω από φίλτρο UV και μεγέθυνση X 400.

Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 17), φαίνονται οι σχηματισμοί του πυρηνικού DNA μετά από χρώση με Hoechst 33342 και διακρίνονται οι διάφορες τάξεις, ανάλογα με την έκταση της προκαλούμενης ζημιάς στο DNA των κυττάρων. Η εικόνα αυτή τραβήχτηκε κατά την διάρκεια των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο πανεπιστήμιο Ιωαννίνων με μικροσκόπιο φθορισμού (Axiovert S 100, Zeitz, φίλτρο UV, μεγέθυνση X 400).



Εικ. 17 Σχηματισμοί του πυρηνικού DNA μετά από ανάλυση με την τεχνική Comet assay. Μετά την έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 τα κύτταρα αναλύθηκαν, όπως αναφέρθηκε αναλυτικά προηγουμένως. Το πυρηνικό DNA μετά από χρώση με Hoechst 33342 φωτογραφήθηκε σε μικροσκόπιο φθορισμού. (Α) τάξη 0, (Β) τάξη 1, (Γ) τάξη 2, (Δ) τάξη 3, (Ε) τάξη 4 .

7.2 Τεστ Ανάλυσης της Διασποράς Χρωματίνης των Σπερματοζωαρίων (Sperm Chromatin Dispersion Test)

7.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Η τεχνική διασποράς της χρωματίνης του σπέρματος (Sperm Chromatin Dispersion Test), η οποία εντοπίζει τη ζημιά στο DNA των σπερματοζωαρίων που οφείλεται στην κρυοζημιά κατά τη διάρκεια της κρυοδιατήρησης (Ankem *et al.*, 2002), πραγματοποιήθηκε στο αποψυγμένο σπέρμα των κεφάλων, το οποίο είχε κρυοδιατηρηθεί, μετά την αραίωση του με διάφορα κρυοπροστατευτικά διαλύματα, για την εκτίμηση της προστασίας που παρείχαν αυτά τα διαλύματα στην ακεραιότητα των αποψυγμένων σπερματοζωαρίων. Αρχικά το διάλυμα του σπέρματος, αραιώθηκε με το κατάλληλο διάλυμα ακινητοποίησης, ώστε να φτάσει τελική συγκέντρωση των $5^6 - 10^6$ σπερματοζωαρίων ml^{-1} .

Τα φιαλίδια, που περιείχαν την, χαμηλού σημείου τήξης, αγαρόζη, τοποθετήθηκαν σε ένα μέσο επίπλευσης και αφέθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 90°C για, τουλάχιστον, 5 min. Στη συνέχεια, τα φιαλίδια που περιέχουν την αγαρόζη, τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο με θερμοστάτη και παρέμειναν για χρονικό διάστημα 5 min, σε θερμοκρασία 37°C , ώστε να εξισορροπηθεί η θερμοκρασία της αγαρόζης. Όταν η θερμοκρασία της αγαρόζης σταθεροποιήθηκε στους 37°C , προστέθηκαν στο φιαλίδιο 20 μικρολίτρα από το διάλυμα σπέρματος και το διάλυμα ανακινήθηκε προσεκτικά, ώστε να ομογενοποιηθεί.

Από το διάλυμα σπέρματος, λήφθηκε μια σταγόνα του αιωρήματος κυττάρων με μια μικροπιπέτα, τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα, η οποία είχε προηγουμένως τοποθετηθεί στο ψυγείο, και καλύφθηκε με καλυπτρίδα $2 \times 2 \text{ cm}$. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί, κατά την τοποθέτηση της καλυπτρίδας, ώστε να αποτραπεί η δημιουργία φουσαλίδων. Η αντικειμενοφόρος διατηρείται σε οριζόντια θέση. Στη συνέχεια, η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε σε ένα γυάλινο δοχείο, το οποίο είχε προηγουμένως ψυχθεί στους 4°C , και αφέθηκε στο ψυγείο για 5 λεπτά, ώστε να στερεοποιηθεί το δείγμα.

Με το πέρας αυτού του διαστήματος, η αντικειμενοφόρος βγήκε από το ψυγείο και προσεκτικά αφαιρέθηκε η καλυπτρίδα που κάλυπτε το δείγμα. Στη συνέχεια, απαλά προστέθηκε στο γυάλινο δοχείο που περιέχει την αντικειμενοφόρο, το διάλυμα Α, που παράχθηκε με την ανάμιξη 800 μl του αποδιατακτικού παράγοντα, με 100 ml απεσταγμένου νερού, και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 7 λεπτά.

Με τη βοήθεια λαβίδας, η αντικειμενοφόρος αφαιρέθηκε από το διάλυμα Α και επωάστηκε στο διάλυμα Β (διάλυμα λύσης) για 2 min και 30 sec, ενώ στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε άλλο δοχείο, όπου έγιναν πλύσεις με άφθονο απεσταγμένο νερό για 5 min, για να απομακρυνθεί ότι έχει απομείνει από το διάλυμα λύσης.

Για την αφυδάτωση του δείγματος, η αντικειμενοφόρος τοποθετήθηκε σε διαδοχικά μπάνια αιθανόλης 70, 90 και 100%, για 2 min στο καθένα, και αφέθηκε στον αέρα. Μετά την ξήρανση της αντικειμενοφόρου, αυτή μπορεί να αποθηκευτεί σε κουτί αρχειοθέτησης, έως και μερικούς μήνες.

7.2.2 Χρώση του δείγματος

Για την χρώση του δείγματος, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Wright (Merck 1.01383.0500) σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, pH 6.88 (Merck 1.07294.1000), ενώ χρησιμοποιήθηκε στερεωτικό διάλυμα Eukitt, (Panreac 253681).

Για την παραγωγή του διαλύματος Wright, έγινε ανάμιξη του διαλύματος που υπάρχει στη συσκευασία με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7.2), σε αναλογία 1:1. Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε σε οριζόντια θέση, το δείγμα καλύφθηκε με ένα λεπτό στρώμα του διαλύματος χρώσης και αφέθηκε έτσι για 5 - 10 min. Με το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, το διάλυμα χρώσης απομακρύνθηκε, το δείγμα πλύθηκε ήπια και για μικρό χρονικό διάστημα, με νερό βρύσης και ξηράνθηκε στον αέρα.

Στη συνέχεια, η αντικειμενοφόρος τοποθετήθηκε κάτω από οπτικό μικροσκόπιο, όπου ελέγχθηκε ο χρωματισμός του δείγματος και επιβεβαιώθηκε ότι καθαρά διακρίνεται η περιφέρεια της στεφάνης.

Σε αυτό το πείραμα, εάν το αποτέλεσμα της χρώσης είναι πολύ ασθενές, ιδιαίτερα στην περιοχή της διασποράς της χρωματίνης του πυρήνα στη στεφάνη, η αντικειμενοφόρος μπορεί να επαναχρωματιστεί με διάλυμα Wright, ενώ εάν ο χρωματισμός είναι πολύ έντονος, η αντικειμενοφόρος μπορεί να αποχρωματιστεί με το ήπιο πλύσιμο της με νερό βρύσης ή μεθανόλη 10%, να αποξηρανθεί στον αέρα και να επαναχρωματιστεί με μειωμένη διάρκεια έκθεσης στη χρώση (Fernantez *et al.*, 2003). Στην παρούσα εργασία το αποτέλεσμα της χρώσης ήταν κατάλληλο για την συνέχεια του πειράματος, οπότε δεν ακολουθήθηκε επιπλέον χρώση ή αποχρωματισμός του δείγματος.

Το πείραμα, επαναλήφθηκε με την παρατήρηση του δείγματος κάτω από μικροσκόπιο φθορισμού, μετά από χρώση του δείγματος με ειδικό διάλυμα φθορισμού.

Για την δημιουργία του διαλύματος φθορισμού, σε δοχείο erpendorf τοποθετήθηκε 1ml από το διάλυμα Hank's και 10μl από την ουσία Propidium Iodide (P4170, Sigma Aldrich) (διάλυμα 1mg PI / ml PBS). Η σύσταση του διαλύματος Hank, φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί (Πιν. 5).

Πιν. 5 Σύσταση διαλύματος Hank

KCl	4.00 g l⁻¹
KH₂PO₄	0.60
NaCl	60.00
Na₂HPO₄	0.477
D-Glucose	10.00 g l⁻¹
Phenol red, Na	0.10
NaHCO₃	0,35 g l⁻¹
Διάλυμα Σκόνης 7,5%	4.67 ml l⁻¹

Σε ένα άλλο δοχείο erpendogf τοποθετήθηκε 1ml από το διάλυμα Hank's και 1μl από την ουσία FDA (7378-5G της Sigma Aldrich) (αφού πρώτα διαλύθηκε σε ακετόνη). Τα παραπάνω έγιναν σε συνθήκες σκότους. Μετέπειτα, σε ένα δισκίο Petri, έγινε ανάμιξη 10μl από το διάλυμα του σπέρματος και 10μl του διαλύματος PI και αφέθηκε για χρονικό διάστημα 5

λεπτών, ώστε τα νέα διαλύματα να έρθουν σε κατάσταση ισορροπίας. Εν συνεχεία, τοποθετήθηκαν 10μl αυτού του διαλύματος σε αντικειμενοφόρο, καλύφθηκε με καλυπτρίδα 2 x 2 cm και εξετάστηκε το δείγμα σε μικροσκόπιο φθορισμού. Τα κύτταρα που δέχθηκαν και κατακράτησαν την ουσία PI ήταν τα νεκρά κύτταρα και στο μικροσκόπιο εμφανίζονταν με κόκκινο χρώμα.

Τα νουκλεοτίδια, ανάλογα με τον βαθμό του αποπρωτεϊνισμού των νουκλεοτιδίων των σπερματοζωαρίων, αποτελούνται από δύο τμήματα, τον πυρήνα, που εμφανίζεται στο κέντρο και στο περιφερειακό στεφάνι, το οποίο σχετίζεται με τα δαχτυλίδια διασποράς της χρωματίνης / DNA.

7.3 Trypan Blue

Η χρώση του δείγματος με Trypan Blue, για τον εντοπισμό της κρυοζημιάς στα κύτταρα του σπέρματος των ψαριών, με την περατότητα αυτής της ουσίας στα μη βιώσιμα κύτταρα, πραγματοποιήθηκε στο σπέρμα των λούτσων.

Η τεχνική χρώσης με Trypan Blue, βασίζεται στην αρχή ότι τα ζωντανά κύτταρα διαθέτουν ακέραιη την κυτταρική τους μεμβράνη, η οποία εμποδίζει την είσοδο χρωστικών ουσιών (Χατζάκη, 2002).

Το σπέρμα, μπορεί να βαφεί με Trypan Blue και να μετρηθεί κάτω από το μικροσκόπιο για το ποσοστό των άθικτων (ζωντανών, μη χρωματισμένων) και αυτών που έχουν υποστεί βλάβη (νεκρών - κηλιδωμένων) σπερματοζωαρίων (Rurangwa et al, 2002; Fitzsimmons et al, 2007).

Για την χρώση του δείγματος, τοποθετήθηκε μια πολύ μικρή ποσότητα του αραιωμένου σπέρματος σε αποστειρωμένο δοχείο και προστέθηκε όγκος διαλύματος Trypan Blue 0.4% και έγινε ήπια ανάμιξη αυτών. Το διάλυμα αφέθηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία λήφθηκε μια πολύ μικρή ποσότητα του διαλύματος, τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα και καλύφθηκε με καλυπτρίδα 2 x 2 cm. Για την ανίχνευση της κρυοβλάβης, έγινε εστίαση του δείγματος σε μικροσκόπιο φθορισμού (OLYMPUS CX 41), για την παρατήρηση των σπερματοζωαρίων, στα οποία η χρωστική έχει διαπεράσει την μεμβράνη τους, άρα είναι νεκρά και στα ζωντανά, τα οποία δεν έχουν χρωματιστεί.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΓΟΝΑΔΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΟΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Το βάρος των αναπαραγωγικών αδένων των 4 ψαριών *Sphyraena sphyraena*, ήταν 1.4 g , 2.1 g, 2.4 g και 3.5 g αντίστοιχα (Εικόνα 18). Στον πίνακα, που ακολουθεί φαίνεται ο γοναδικός δείκτης των λούτσων (Πιν. 6).

Πιν. 6 Γοναδικός δείκτης των λούτσων

	ΟΛΙΚΟ ΒΑΡΟΣ (σε g)	ΒΑΡΟΣ ΑΝΑΠ. ΑΔΕΝΩΝ (σε g)	ΓΟΝΑΔΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ (%)
1	99.4	1.4	1.4
2	82.7	2.1	2.5
3	74.6	2.4	3.2
4	197.1	3.5	1.7
Μέση τιμή	113.45	2.35	2.2
Τυπική απόκλιση	56.71	0.87	8,1

Οι αναπαραγωγικοί αδένες των κεφάλων ζυγίστηκαν και τα αποτελέσματα που βρέθηκαν ήταν 44.8 g, 33.8 g, 52.8 g και 52.4 g (Εικόνα 19). Στον πίνακα που ακολουθεί, φαίνεται ο γοναδικός δείκτης αυτών των ψαριών καθώς και ο αριθμός των σπερματοζωαρίων (Πιν. 7).

Πιν. 7 Γοναδικός δείκτης των κεφάλων

	ΟΛΙΚΟ ΒΑΡΟΣ (σε g)	ΒΑΡΟΣ ΑΝΑΠ. ΑΔΕΝΩΝ (σε g)	ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΣΠΕΡΜ. X 10 ¹⁰ κύτταρα ml ⁻¹	ΓΟΝΑΔΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ (%)
1	722.,4	44.8	5.36	6.2
2	701.5	33.8	5.34	4.8
3	785.8	52.8	5.38	6.7
4	827.1	52.4	5.35	6.3
Μέση τιμή	759.2	45.95	5.35	6
Τυπική απόκλιση	43.89	8.89	0.017	8.2



Εικ. 18 Κοιλιακή χώρα ψαριού *S. Sphyraena*



Εικ. 19 Κοιλιακή χώρα ψαριού *M. cephalus*

2. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΝΩΠΟ ΣΠΕΡΜΑ

Η εκτίμηση της κινητικότητας έγινε από δύο παρατηρητές, για μεγαλύτερη ασφάλεια στο αποτέλεσμα. Κινητικά θεωρήθηκαν τα σπερματοζωάρια που παρουσίασαν εμπρόσθια κίνηση και όχι αυτά που εμφάνισαν είδος ταλάντωσης, ενώ η διάρκεια της κινητικότητας, αναφέρεται

στην συνολική διάρκεια της κίνησης, συμπεριλαμβάνοντας την κινητοποίηση του μαστίγιου χωρίς μετατόπιση.

Για τους λούτσους, η εκτίμηση της κινητικότητας πραγματοποιήθηκε στο σπέρμα του κάθε ατόμου, αλλά και στο αναμεμιγμένο σπέρμα των αρσενικών.

Αναλυτικά, το σπέρμα στο πρώτο ψάρι (βάρους 99.4 g), παρουσίασε κινητικότητα σε ένα ποσοστό της τάξης του 20 - 30% και η κίνηση των σπερματοζωαρίων και η ταχύτητα κολύμβησης, ήταν αρκετά έντονη, ενώ ένα ποσοστό της τάξης του 10% των ολικών σπερματοζωαρίων, εμφάνισε ταλάντωση, κυρίως διαγράφοντας έναν κύκλο μικρής ακτίνας ή κινούμενα γύρω από τον άξονα τους. Στο δεύτερο ψάρι (βάρους 82.7 g), το σπέρμα παρουσίασε κινητικότητα σε ποσοστό της τάξης του 30 - 40%, η κίνηση των σπερματοζωαρίων και η ταχύτητα κολύμβησης ήταν έντονη και υπήρχε ένα ποσοστό περίπου 10% που εμφάνισαν έντονες κινήσεις ταλάντωσης. Στο τρίτο ψάρι (βάρους 74.6 g), τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με το δεύτερο ψάρι, με ποσοστό κινητικότητας 30 -40%, έντονη κίνηση και περίπου 10% των σπερματοζωαρίων, να εμφανίζει έντονη ταλάντωση. Στο τέταρτο ψάρι (βάρους 197.1 g), τα αποτελέσματα ήταν τα λιγότερο ικανοποιητικά, καθώς το ποσοστό έντονης κινητικότητας ήταν περίπου 20%, ενώ ένα ποσοστό της τάξης του 20% των ολικών σπερματοζωαρίων, εμφάνισε ταλάντωση, μικρότερης ή μεγαλύτερης έντασης. Το αναμεμιγμένο σπέρμα αυτών των ψαριών, εμφάνισε κινητικότητα στο περίπου 30 - 40% των σπερματοζωαρίων. Η διάρκεια της κίνησης του σπέρματος αυτών των ψαριών ήταν μικρότερη από 3 min, καθώς ο ακριβής υπολογισμός της διάρκειας δεν στάθηκε δυνατός, λόγω έλλειψης εμπειρίας σχετικά με την στιγμή έναρξης και λήξης της μέτρησης.

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν κατά την εκτίμηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων των κεφάλων, για το πρώτο ψάρι (βάρους 722.4 g), εμφάνισαν ποσοστό κινητικότητας της τάξης του 30 - 40% και η κίνηση των σπερματοζωαρίων και η ταχύτητα κολύμβησης, ήταν έντονη, ενώ ένα ποσοστό της τάξης του 10% των ολικών σπερματοζωαρίων, εμφάνισε κινήσεις ταλάντωσης. Η διάρκεια της κινητικότητας αυτών των σπερματοζωαρίων, υπολογίστηκε στα 7 min και 30 sec. Στο δεύτερο ψάρι (βάρους 701.5 g), το σπέρμα παρουσίασε κινητικότητα σε ποσοστό της τάξης

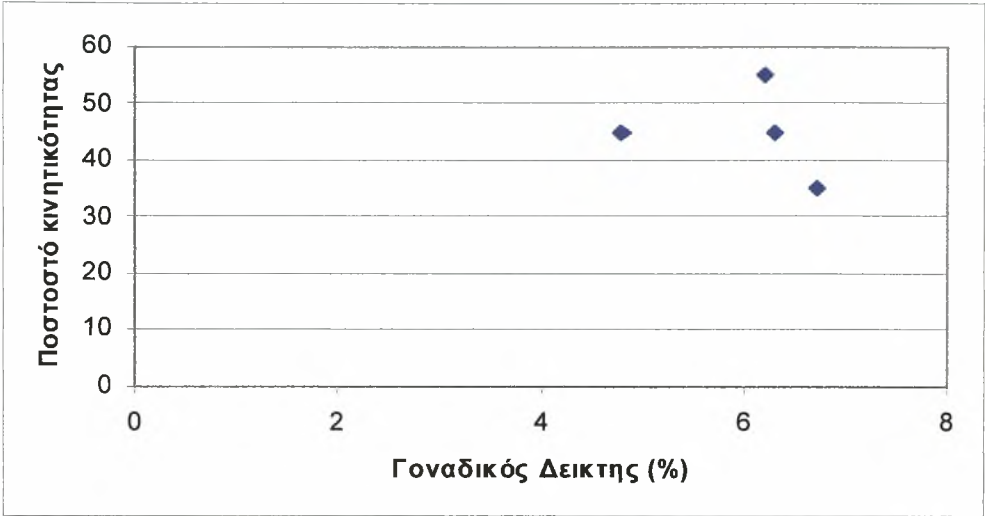
40 - 50%, η κίνηση των σπερματοζωαρίων και η ταχύτητα κολύμβησης ήταν έντονη και υπήρχε ένα ποσοστό περίπου 10% που εμφάνισαν έντονη ταλάντωση, ενώ η διάρκεια της κινητικότητας ήταν περίπου 7 min και 45 sec. Στο τρίτο ψάρι (βάρους 785.8 g), τα αποτελέσματα ήταν τα καλύτερα, σε σχέση με τα άλλα ψάρια. Έτσι, το ποσοστό κινητικότητας ήταν περίπου 50 - 60%, η κίνηση των σπερματοζωαρίων και η ταχύτητα κολύμβησης ήταν πολύ έντονη, ενώ η διάρκεια της κινητικότητας ήταν περίπου 7 min και 40 sec. Στο τέταρτο ψάρι (βάρους 827.1 g), το ποσοστό κινητικότητας κυμαίνονταν στο 40 - 50%, η κίνηση ήταν έντονη, το 10% των ολικών σπερματοζωαρίων, εμφάνισε ταλάντωση και η διάρκεια της κινητικότητας υπολογίστηκε περίπου στα 7 min και 20 sec.

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πιν. 8), παρουσιάζονται συγκεντρωτικά, το είδος των ψαριών, το βάρος τους, ο γοναδικός δείκτης (Γ.Δ), το ποσοστό κινητικότητας (Π.Κ.) και η διάρκεια της κινητικότητας (Δ.Κ.).

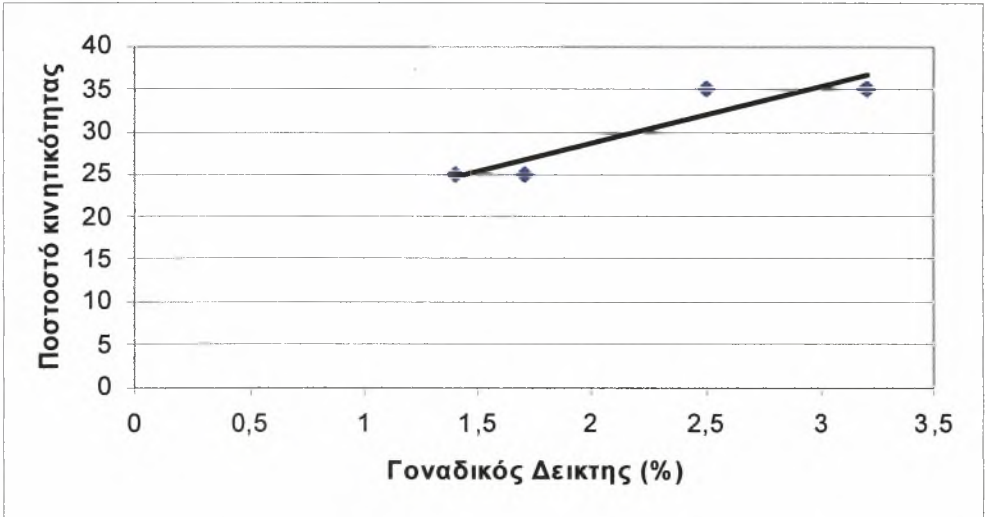
Πιν. 8 Χαρακτηριστικά του σπέρματος των ψαριών (Βάρος : σωματικό βάρος, Γ.Δ: γοναδοσωματικός δείκτης, Π.Κ.: ποσοστό κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, Δ.Κ.: διάρκεια κινητικότητας).

ΕΙΔΟΣ ΨΑΡΙΟΥ	ΒΑΡΟΣ (σε gr)	Γ.Δ.(%)	Π.Κ.(%)	Δ.Κ. (σε min)
<i>S. sphyraena</i>	99.4	1.4	20-30	< 3
<i>S. sphyraena</i>	82.7	2.5	30-40	< 3
<i>S. sphyraena</i>	74.6	3.2	30-40	< 3
<i>S. sphyraena</i>	197.1	1.7	20-30	< 3
<i>M. cephalus</i>	722.4	6.7	30-40	7:30
<i>M. cephalus</i>	701.5	6.3	40-50	7:50
<i>M. cephalus</i>	785.8	6.2	50-60	7:50
<i>M. cephalus</i>	827.1	4.8	40-50	7:20

Στα διαγράμματα 2 και 3, φαίνονται η σχέση του γοναδικού δείκτη με το ποσοστό κινητικότητας των σπερματοζωαρίων.



Διάγρ. 2 Συσχέτιση του γοναδικού δείκτη με το ποσοστό κινητικότητας των σπερματοζωαρίων των *Mugil cephalus*



Διάγρ. 3 Συσχέτιση του γοναδικού δείκτη με το ποσοστό κινητικότητας των σπερματοζωαρίων των *S. sphyraena*

Από τα δεδομένα του ποσοστού γοναδικού δείκτη και του ποσοστού κινητικότητας, στους λούτσους εμφανίζεται συσχέτιση $r=0.923$ και $p=0.07$, ενώ στους κέφαλους οι αντίστοιχες τιμές ήταν $r=0.246$ και $p=0.28$.

3. ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗ ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΣΤΟΥΣ 4°C

1^ο Πείραμα

Η εκτίμηση της βραχυπρόθεσμης συντήρησης του σπέρματος, αρχικά διεξήχθη στο σπέρμα του κεφάλου βάρους 785.8 g, το οποίο παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό κινητικών σπερματοζωαρίων και βρέθηκε ότι με το πέρας 30 min από την τοποθέτηση των δειγμάτων σε θερμοκρασία 4°C, το μη αραιωμένο σπέρμα εμφάνισε κινητικότητα στο 40 - 50% των σπερματοζωαρίων και η διάρκεια αυτής υπολογίστηκε στα 6 min και 30 sec. Επίσης, το σπέρμα με το διάλυμα ακινητοποίησης, παρουσίασε κινητικότητα περίπου 40% και η διάρκεια ήταν 5 min και 45 sec. Για το διάλυμα του σπέρματος με το κρυοπροστατευτικό DMSO και λέκιθο αυγού, τα αντίστοιχα νούμερα ήταν 30 - 40% και 4 min και 40 sec. Η μεθανόλη, παρουσίασε κινητικότητα στο 30% των σπερματοζωαρίων και διάρκεια κίνησης 4 min και 10 sec, ενώ η αιθυλενογλυκόλη, επίσης, είχε κινητικά το 30% των σπερματοζωαρίων και διάρκεια περίπου 4 min.

Στα 60 min, τα αποτελέσματα που ελήφθησαν δεν παρουσίασαν αξιοσημείωτες διαφορές σε σχέση με τις προηγούμενες.

Οι επόμενες μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στα 150 min από την έναρξη του πειράματος, εμφάνισαν μικρές αλλαγές σε σχέση με τις προηγούμενες, σε ορισμένα διαλύματα. Έτσι, το μη αραιωμένο σπέρμα εμφάνισε κινητικότητα στο 40 - 50% των σπερματοζωαρίων και διάρκεια κίνησης 5 min και 50 sec. Το διάλυμα ακινητοποίησης, παρουσίασε κινητικότητα στο περίπου 40% των σπερματοζωαρίων και η διάρκεια ήταν περίπου 5 min. Στο αραιωμένο σπέρμα με το DMSO και λέκιθο αυγού, το ποσοστό κινητικότητας ήταν 30 - 40% και η διάρκεια 3 min και 30 sec. Η μεθανόλη και το EG, παρουσίασαν κινητικότητα στο 30% των σπερματοζωαρίων, ενώ η διάρκεια της κίνησης ήταν 3 min και 20 sec και 2 min και 50 sec, αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα κινητικά σπερματοζωάρια, είχαν έντονη κίνηση και κολυμβητική ταχύτητα.

Στις μετρήσεις που διεξήχθησαν 4 ώρες μετά (240 min), οι όποιες διαφορές σημειώθηκαν στην διάρκεια της κίνησης και όχι τόσο στο ποσοστό των κινητικών σπερματοζωαρίων. Στο σπέρμα που παρέμεινε στους αναπαραγωγικούς αδένες των αρσενικών, το ποσοστό κινητικότητας ήταν

περίπου 40% και η διάρκεια ήταν 4 min και 20 sec, ενώ και στο σπέρμα με το διάλυμα ακινητοποίησης τα κινητικά σπερματοζωάρια ήταν 40% και η διάρκεια κυμάνθηκε στα περίπου 4 min. Στο διάλυμα σπέρματος με DMSO και λέκιθο αυγού, τα αντίστοιχα νούμερα ήταν 30 - 40% και 2 min και 50 sec, ενώ το διάλυμα μεθανόλης παρουσίασε 30% κινητικά σπερματοζωάρια και διάρκεια 1 λεπτό και 40 sec. Το σπέρμα με το διάλυμα EG, παρουσίασε πτώση στο ποσοστό των κινητικών σπερματοζωαρίων, με 20% και η διάρκεια 1 λεπτό και 30 sec.

Στις 6 ώρες (360 min) από την έναρξη του πειράματος, τα αποτελέσματα της κινητικότητας παρουσίασαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις προηγούμενες, σε ορισμένα διαλύματα. Το μη αραιωμένο σπέρμα, παρουσίασε κινητικότητα στο 30 -40% των σπερματοζωαρίων και η διάρκεια ήταν 3 min, ενώ το σπέρμα με το διάλυμα ακινητοποίησης, παρουσίασε ποσοστό κινητικότητας 30 - 35% και η διάρκεια ήταν 3 min και 10 sec. Στο διάλυμα σπέρματος με DMSO και λέκιθο αυγού, το ποσοστό κινητικότητας ήταν 20 - 30% και η διάρκεια κίνησης 2 min και 20 sec, ενώ το σπέρμα με το διάλυμα μεθανόλης, είχε κινητικότητα στο περίπου 15-20% των σπερματοζωαρίων και η διάρκεια ήταν περίπου 1 λεπτό. Τέλος το διάλυμα σπέρματος με το EG, παρουσίασε ποσοστό κινητικότητας στο 15% περίπου και η διάρκεια ήταν περίπου 50 sec. Τα κινητικά σπερματοζωάρια, σε αυτές τις περιπτώσεις, διατήρησαν την ταχύτητα και την ένταση στην κίνηση τους.

Οι επόμενες μετρήσεις, που διεξήχθησαν 24 ώρες μετά από την αραιώση του σπέρματος με τα διαλύματα και την τοποθέτηση τους σε θερμοκρασία 4°C, εμφάνισαν αποτελέσματα με αρκετές διαφορές. Καταρχήν, το σπέρμα που διατηρήθηκε στο ψυγείο παραμένοντας στους αναπαραγωγικούς αδένες, δεν παρουσίασε καμία κινητικότητα στο οπτικό μικροσκόπιο με την αραιώση του με το διάλυμα ενεργοποίησης. Αντίθετα, το σπέρμα που αποθηκεύτηκε με το διάλυμα ακινητοποίησης, διατήρησε κινητικά σπερματοζωάρια σε ποσοστό 30%, διάρκεια κίνησης περίπου 3 min και έντονη κίνηση και ταχύτητα κολύμβησης. Το διάλυμα του σπέρματος με DMSO και λέκιθο αυγού, παρουσίασε ποσοστό κινητικότητας 20 - 30% και διάρκεια περίπου 2 min, ενώ η κίνηση ακόμη ήταν έντονη. Το διάλυμα σπέρματος με την μεθανόλη, εμφάνισε κινητικότητα στο 10 - 15% των σπερματοζωαρίων και διάρκεια 40 sec και παρόμοια ήταν τα νούμερα και για

το διάλυμα σπέρματος και EG, ενώ σε αυτά τα διαλύματα και η ένταση και η ταχύτητα της κίνησης ήταν μειωμένη.

Στις μετρήσεις που διεξήχθησαν στις 30 ώρες, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές και τα ποσοστά κινητικότητας και η διάρκεια τους, ήταν σχεδόν τα ίδια με τις προηγούμενες.

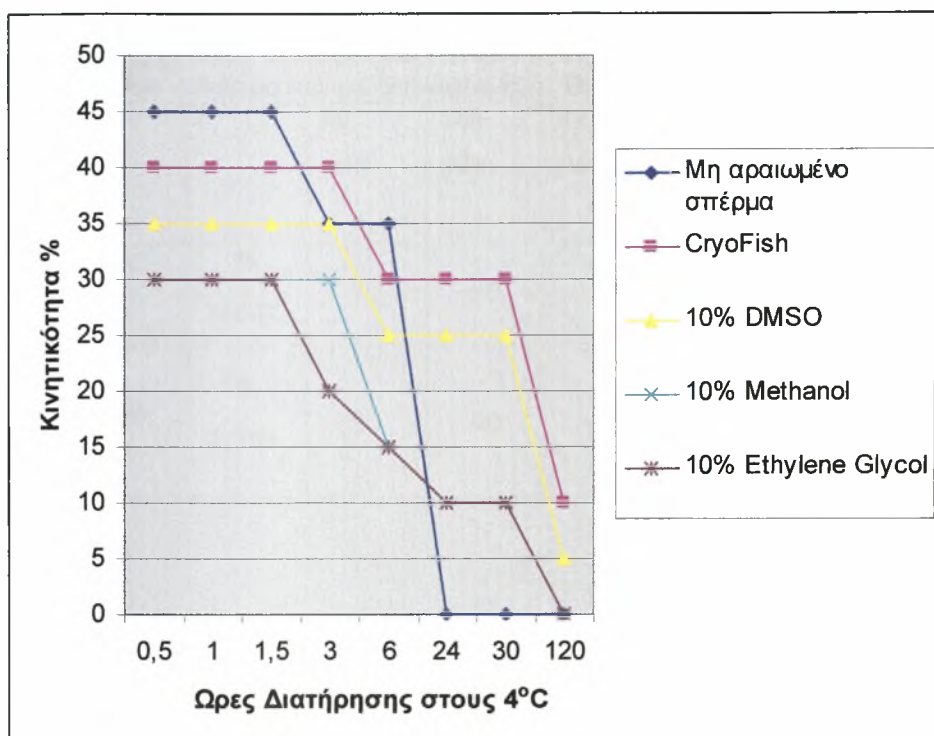
Τα επόμενα αποτελέσματα, ελήφθησαν 5 ημέρες (120 ώρες) μετά την έναρξη του πειράματος και εμφάνισαν σημαντικά αποτελέσματα, καθώς υπήρχε απώλεια κινητικότητας σε ορισμένα δείγματα. Έτσι, τα διαλύματα σπέρματος με μεθανόλη και EG, δεν παρουσίασαν κινητικότητα σε αυτό το χρονικό διάστημα. Στο διάλυμα σπέρματος με DMSO και λέκιθο αυγού, τα κινητικά σπερματοζωάρια ήταν περίπου 5%, η διάρκεια ήταν 30 sec και η κίνηση δεν ήταν έντονη, ενώ τα καλύτερα αποτελέσματα εμφανίστηκαν με το διάλυμα ακινητοποίησης, καθώς το ποσοστό κινητικότητας ήταν περίπου 10 % και η διάρκεια 40 sec.

Οι τελευταίες μετρήσεις διεξήχθησαν στις 7 ημέρες από την αποθήκευση του σπέρματος και τα αποτελέσματα για το αραιωμένο σπέρματος με το διάλυμα ακινητοποίησης παρουσίασαν μια πολύ μικρή κίνηση, η οποία περισσότερο έμοιαζε με ταλάντωση σε ποσοστό, μικρότερο από 5% των σπερματοζωαρίων, ενώ στο διάλυμα σπέρματος με DMSO και λέκιθο αυγού, ελάχιστα σπερματοζωάρια εμφάνισαν κάποια στοιχειώδη ταλάντωση.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για το κάθε διάλυμα, φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα (Πιν. 9) και στο διάγραμμα (Διάγρ.4) που ακολουθούν.

Πιν. 9 Κρυοσυντήρηση (4 °C) στο σπέρμα του *Mugil cephalus*, μη αραιωμένου σπέρματος (χωρίς διάλυμα ακινητοποίησης και κρυπροστατευτικά,) και αραιωμένου σπέρματος με διάλυμα ακινητοποίησης (CryoFish) και με διαλύματα 10% DMSO και 10% Egg Yolk, 10% Methanol, 10% Ethylene Glycol

	30 min	60 min	150 min	240 min	360 min	24 hour	30 hour	5 days	7 days
Μη αραιωμένο σπέρμα									
% κινητ.	40-50	40-50	40-50	30-40	30-40	X	X	X	X
διάρκεια	6:30	6:30	5:50	4:20	3:00	X	X	X	X
CryoFish									
% κινητ.	40	40	40	40	30-35	30	30	10	<5%
διάρκεια	5:45	5:40	5:00	4:00	3:00	2:50	0:40	0:40	0:10
10% DMSO 10% Egg Yolk									
% κινητ.	30-40	30-40	30-40	30-40	20-30	20-30	20-30	5	X
διάρκεια	4:40	4:40	3:30	2:50	2:20	2:00	1:40	0:30	X
10% Methanol									
% κινητ.	30	30	30	30	15-20	10-15	10-15	X	X
διάρκεια	4:10	4:10	3:20	1:40	1:00	0:40	0:40	X	X
10% Ethylene Glycol									
% κινητ.	30	30	30	20	15	10-15	10-15	X	X
διάρκεια	4:00	4:00	2:50	1:30	0:50	0:40	0:40	X	X



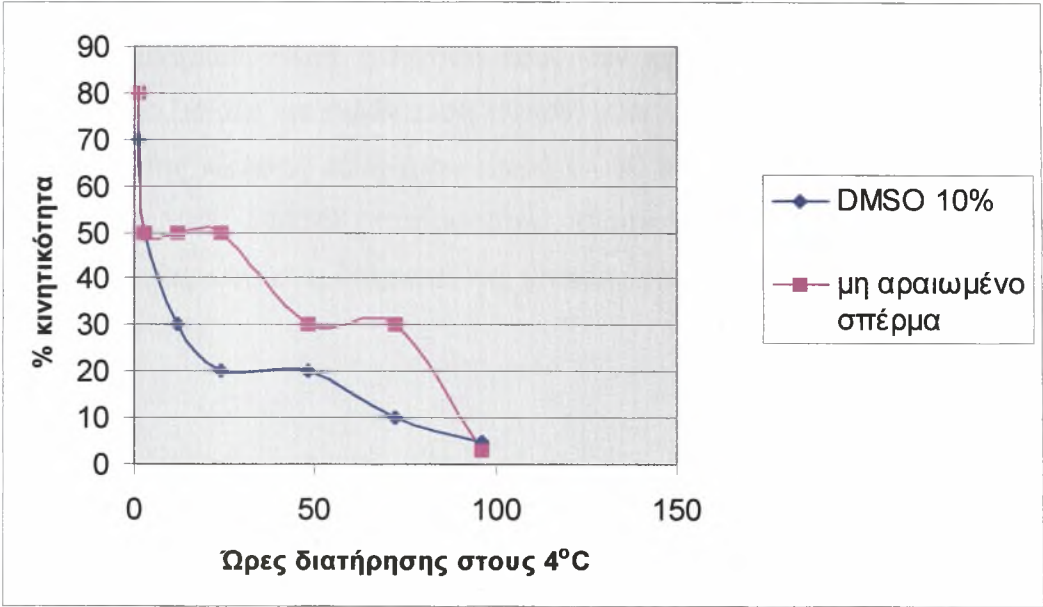
Διάγρ. 4 Αποτελέσματα βραχυπρόθεσμης διατήρησης σπέρματος του *Mugil cephalus* με διάφορα κρυοπροστατευτικά διαλύματα. Ποσοστά κινητικότητας σπερματοζωαρίων που αραιώθηκαν μόνο με διάλυμα ακινητοποίησης, με διάλυμα DMSO και Egg Yolk, με διάλυμα μεθανόλης, με διάλυμα αιθυλενογλυκόλης, καθώς και του μη αραιωμένου σπέρματος

2° Πείραμα

Το πείραμα της βραχυπρόθεσμης διατήρησης σπέρματος, διεξήχθη και για το σπέρμα το οποίο αφαιρέθηκε άμεσα από τους αναπαραγωγικούς αδένες των αρσενικών κεφάλων και μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα δοχεία στο εργαστήριο. Μετά την αραιώση του με τα διαλύματα 10% DMSO, 10% λέκιθο αυγού, καθώς και με το διάλυμα ακινητοποίησης και την διατήρηση του στον ψυκτικό θάλαμο, έγινε έλεγχος της βιωσιμότητας των σπερματοζωαρίων με το πέρας συγκεκριμένων χρονικών διαστημάτων. Τα αποτελέσματα, από τα οποία είναι δυνατή η εκτίμηση της επίδρασης της τοξικότητας του κρυοπροστατευτικού παράγοντα, φαίνονται στον πίνακα 10 και στο διάγραμμα 5 που ακολουθούν.

Πιν. 10 Κρυοσυντήρηση (4 °C) στο σπέρμα του *Mugil cephalus*, μη αραιωμένου σπέρματος (χωρίς διάλυμα ακινητοποίησης και κρυπροστατευτικά) και αραιωμένου σπέρματος με διάλυμα 10% DMSO και 10% Egg Yolk

		60 min	180 min	12 hours	24 hours	48 hour s	72 hour s	96 hours
DMSO και Egg Yolk	% κινητ.	70	50	30	20	20	10	5
Μη αραιωμένο σπέρμα	% κινητ.	80	50	50	50	30	30	3



Διάγρ. 5 Τοξικότητα του DMSO στο σπέρμα του *Mugil cephalus*. Ποσοστά κινητικότητας σπερματοζωαρίων που αραιώθηκαν μόνο με διάλυμα ακινητοποίησης (κύβοι) και με διάλυμα ακινητοποίησης και διάλυμα DMSO και Egg Yolk (ρόμβοι)

4. ΚΡΥΟΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

4.1 Κρυοδιατήρηση σπέρματος του *S. sphyraena*

Η εκτίμηση της κινητικότητας των αποψυγμένων δειγμάτων αραιωμένου σπέρματος των λούτσων, με τα κρυοπροστατευτικά,

διαφορετικής συγκέντρωσης σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και λέκιθο αυγού κότας (Egg Yolk), χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ποιότητας του αποψυγμένου σπέρματος και σαν δείκτης καταλληλότητας του κρυοπροστατευτικού, που εμφάνισε την μεγαλύτερη προστασία στα σπερματοζωάρια από την κρυοζημιά.

Το σπέρμα που κρυοδιατηρήθηκε με την προσθήκη κρυοπροστατευτικού με συγκέντρωση 10% λέκιθο αυγού και 0% DMSO, καθώς και αυτό με 2.5% λέκιθο αυγού, 2.5% DMSO, δεν παρουσίασαν καμία κινητικότητα, μετά την απόψυξη, ούτε καν μικρές κινήσεις ταλάντωσης. Το σπέρμα που καταψύχθηκε με τα κρυοπροστατευτικά συγκέντρωσης 10% Yolk και 5 % DMSO, 10% λέκιθο αυγού και 2.5% DMSO, 5 % λέκιθο αυγού και 5 % DMSO, παρουσίασαν κινητικότητα μόνο 5% στο περίπου των σπερματοζωαρίων, αλλά η κίνηση τους δεν κρίνεται ικανοποιητική, καθώς περισσότερο μοιάζει με ταλάντωση αυτών, γύρω από τον άξονα τους, ενώ και η διάρκεια της κίνησης τους ήταν μικρή (< 30 sec). Το διάλυμα 10% λέκιθο αυγού και 10% DMSO, παρουσίασε κινητικότητα στο 20 – 30% των σπερματοζωαρίων και η διάρκεια της κίνησης τους υπολογίστηκε σε περίπου 55 sec (Πιν. 11).

Πιν. 11 Αποτελέσματα κρυοδιατήρησης σπέρματος *S. sphyraena*

	Κρυοπροστατευτικός παράγοντας	Ποσοστό κινητικότητας σπερματοζωαρίων	Διάρκεια κινητικότητας
1	10% Yolk, 0% DMSO	0	
2	10% Yolk, 5 % DMSO	<5%	<30 sec
3	10% Yolk, 2.5% DMSO	<5%	<30 sec
4	10% Yolk, 10% DMSO	20-30%	55 sec
5	5 % Yolk, 5 % DMSO	<5%	<30 sec
6	2.5% Yolk, 2.5% DMSO	0	

4.2 Κρυοδιατήρηση σπέρματος του *Mugil cephalus*

1^ο Πείραμα

Η κινητικότητα του αποψυγμένου σπέρματος με το διάλυμα διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO) και λέκιθο αυγού (Egg Yolk), στο πρώτο πείραμα, κυμάνθηκε στο 20-30% του συνολικού αριθμού των σπερματοζωαρίων, ενώ η κίνηση και η ταχύτητα κολύμβησης τους, ήταν αρκετά ικανοποιητική. Η διάρκεια της κινητικότητας του αποψυγμένου σπέρματος, ήταν, μειωμένη σε σχέση με το νωπό σπέρμα και υπολογίστηκε στα 3 min και 40 sec.

2^ο Πείραμα

Στο δεύτερο πείραμα, η κινητικότητα του αποψυγμένου σπέρματος με διάλυμα DMSO και λέκιθο αυγού κυμάνθηκε στο 30%, ενώ η κίνηση και η ταχύτητα κολύμβησης του, ήταν αρκετά ικανοποιητικές. Η διάρκεια της κίνησης υπολογίστηκε στα 4 min και 20 sec.

Η χρήση του διαλύματος μεθανόλης (Methanol) 10%, για την κρυοδιατήρηση του σπέρματος των κεφάλων, δεν παρουσίασε ικανοποιητικά αποτελέσματα και στα δύο πειράματα. Η κινητικότητα του αποψυγμένου πειράματος κυμάνθηκε στο 10% και στα δύο πειράματα, η κίνηση των σπερματοζωαρίων δεν ήταν έντονη και η διάρκεια της κίνησης ήταν εμφανώς μειωμένη σε σχέση με το αποψυγμένο σπέρμα και υπολογίστηκε σε περίπου 1 λεπτό και 30 sec και 1 λεπτό και 40 sec, αντίστοιχα, στα δύο πειράματα.

Το διάλυμα 10% αιθυλενογλυκόλης (Ethylene Glycol) παρουσίασε αποτελέσματα, με την παρατήρηση της κινητικότητας του αποψυγμένου σπέρματος κάτω από οπτικό μικροσκόπιο, τα οποία δεν ήταν καθόλου ικανοποιητικά, καθώς η κινητικότητα των αποψυγμένων σπερματοζωαρίων, κυμάνθηκε σε μηδενικά επίπεδα. Πολύ μικρός αριθμός σπερματοζωαρίων παρουσίασαν κάποια ευθύγραμμη κίνηση για πολύ μικρό χρονικό διάστημα και κάποια άλλα σπερματοζωάρια εμφάνισαν πολύ μικρή ταλάντωση.

Τέλος, το διάλυμα ακινητοποίησης που δοκιμάστηκε για την κρυοδιατήρηση του σπέρματος στο δεύτερο πείραμα, είχε όπως αναμένονταν, μηδενικά αποτελέσματα. Το αποψυγμένο σπέρμα που κρυοδιατηρήθηκε με

αυτό το διάλυμα, δεν παρουσίασε καμία κίνηση, με την προσθήκη του διαλύματος ενεργοποίησης.

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πιν. 12), φαίνονται τα κατά προσέγγιση αποτελέσματα των δύο πειραμάτων.

Πιν. 12 Αποτελέσματα κρυοδιατήρησης σπέρματος *Mugil cephalus*

	Κρυοπροστατευτικός παράγοντας	Ποσοστό κινητικότητας σπερματοζωαρίων	Διάρκεια κινητικότητας
1	Διάλυμα ακινητοποίησης	0	-
2	10% Yolk, 10% DMSO	30%	4:00 min
3	10% Methanol	10%	1:45 min
4	10% Ethylene Glycol	<5%	<20 sec

5. COMMET ASSAY

Στην προσπάθεια να εφαρμοστεί η τεχνική Commet Assay σε σπερματοζωάρια ψαριών, έγιναν ορισμένες τροποποιήσεις σε κάποια σημεία του πρωτοκόλλου, στηριζόμενοι σε μελέτες άλλων εργαστηρίων που έχουν εφαρμόσει τη μέθοδο αυτή σε σπερματοζωάρια ιχθύων.

Στα πρώτα πειράματα που έγιναν υπήρξαν αρκετά προβλήματα σχετικά με τον αριθμό των σπερματοζωαρίων σε κάθε δείγμα. Σε κάποια πειράματα, ο αριθμός που επιλέχθηκε ήταν αρκετά μεγάλος, με αποτέλεσμα οι πυρήνες των κυττάρων να αλληλοεπικαλύπτονται, γεγονός που δεν επέτρεπε την καταμέτρηση τους και την κατάταξη τους σε τάξεις. Μετά από μια σειρά πειραμάτων, βρέθηκε ότι ο κατάλληλος αριθμός σε αυτό το σύστημα είναι 150.000 κύτταρα, ανά 100 μl (ανά δείγμα) και επιλέχθηκε αυτός ο αριθμός για τα επόμενα πειράματα.

Από την παρατήρηση στο μικροσκόπιο, φάνηκαν διαφορές στα δείγματα που είχαν διατηρηθεί με τα κρυοπροστατευτικά διαφορετικής συγκέντρωσης σε DMSO και λέκιθο αυγού κότας, που ήταν οι αναμενόμενες. Δηλαδή, τα σπερματοζωάρια που διατηρήθηκαν με τα διαλύματα

συγκέντρωσης 10% λέκιθο αυγού και 0% DMSO, 5 % λέκιθο αυγού και 5 % DMSO, 2.5% λέκιθο αυγού και 2.5% DMSO είχαν μεγαλύτερο ποσοστό βλαβών στο DNA τους, σε σχέση με αυτά που αραιώθηκαν με τα διαλύματα 10% λέκιθο αυγού και 5 % DMSO, 10% λέκιθο αυγού και 2.5% DMSO. Αντίθετα, το σπέρμα που κρυοδιατηρήθηκε με το διάλυμα 10% λέκιθο αυγού και 10% DMSO, παρουσίασε το μικρότερο ποσοστό σπερματοζωαρίων, τα οποία είχαν υποστεί βλάβη στο DNA, το οποίο συμφωνεί με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν κατά την εκτίμηση της κινητικότητας αυτών των δειγμάτων.

Παρόλα αυτά τα πειράματα που έγιναν δεν ήταν αρκετά για να γίνει στατιστική ανάλυση και να μπορούμε να υποστηρίξουμε τα αποτελέσματα και θα χρειαστεί μεγαλύτερη εξάσκηση στην πραγματοποίηση αυτού του πειράματος στα σπερματοζωάρια των ψαριών.

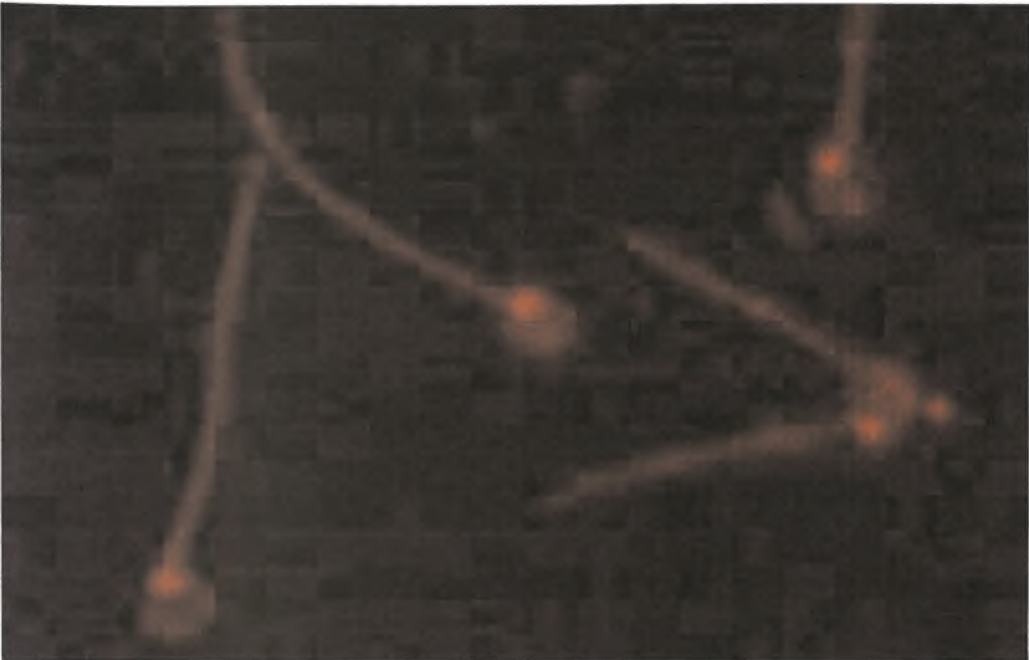
6. ΤΕΣΤ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΤΩΝ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ (SPERM CHROMATIN DISPERSION TEST)

Από την παρατήρηση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο, για τον εντοπισμό της βλάβης στο DNA των σπερματοζωαρίων, εμφανίστηκαν διάφορες εικόνες οι οποίες παρουσιάζουν την επίδραση της κρυοδιατήρησης στο σπέρμα (Εικόνα 20).

Οι εικόνες (α) και (β), είναι η τυπικές που εμφάνισαν τα σπερματοζωάρια που είχαν καταψυχθεί με το διάλυμα DMSO και λέκιθο αυγού και δεν παρουσίασαν σημαντική βλάβη στο DNA

Η εικόνα (γ) είναι η τυπική που εμφάνισαν τα σπερματοζωάρια που είχαν καταψυχθεί με το διάλυμα μεθανόλης, σε ορισμένα από τα οποία παρουσιάστηκε βλάβη στο DNA, ενώ σε κάποια άλλα όχι.

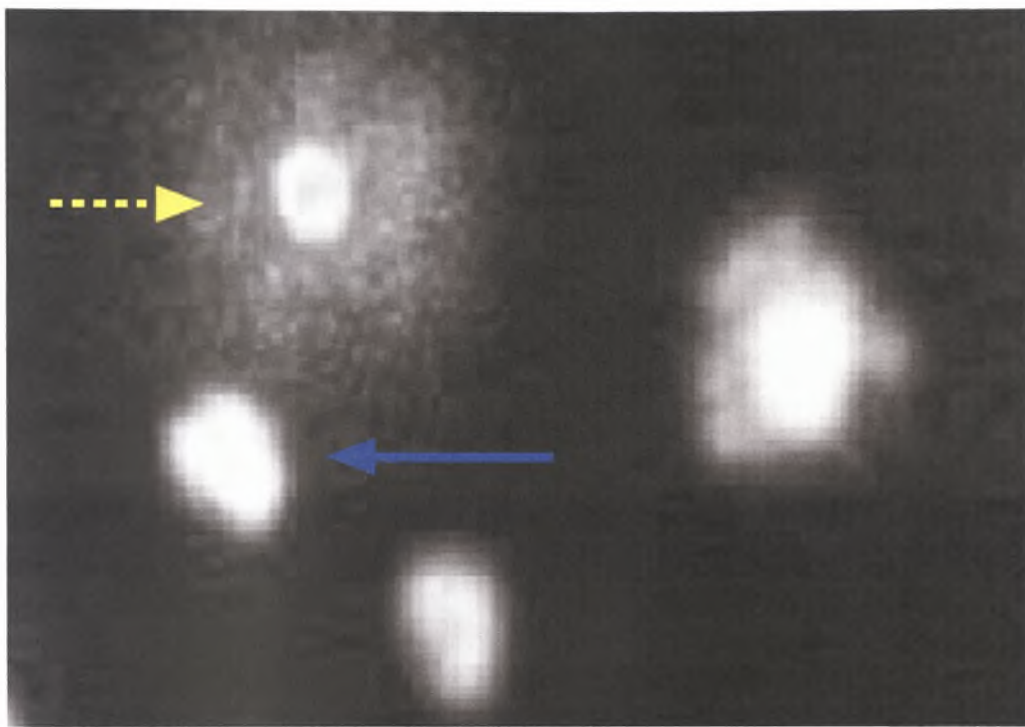
Η εικόνα (δ), είναι η τυπική που εμφάνισαν τα σπερματοζωάρια που είχαν καταψυχθεί με το διάλυμα αιθυλενογλυκόλης και εμφάνισαν αρκετά μεγάλο ποσοστό σπερματοζωαρίων με σημαντική βλάβη στο DNA.



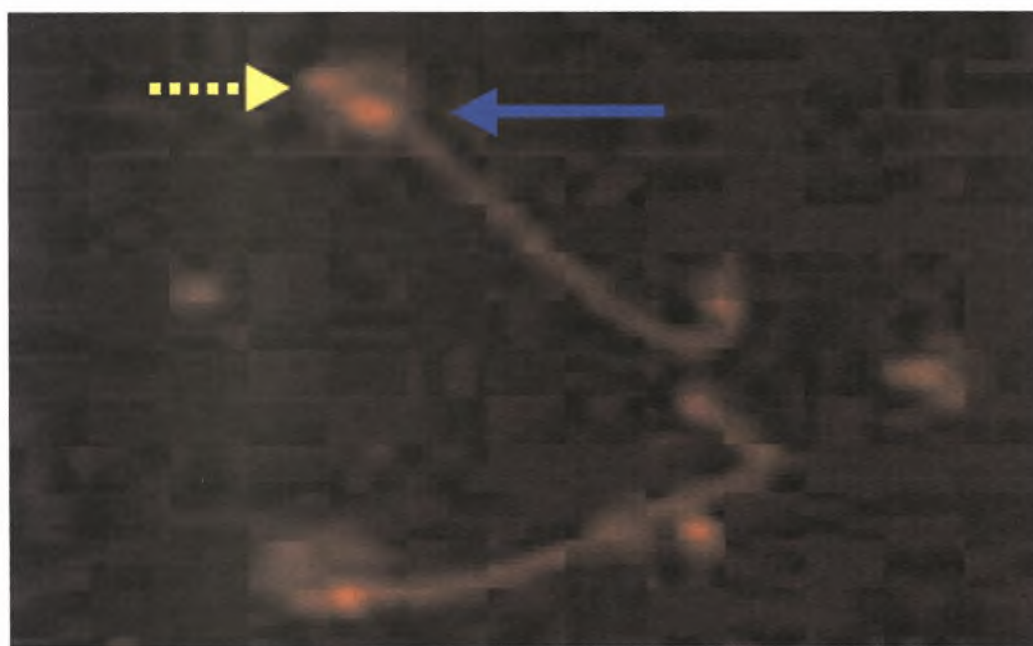
(α)



(β)



(γ)



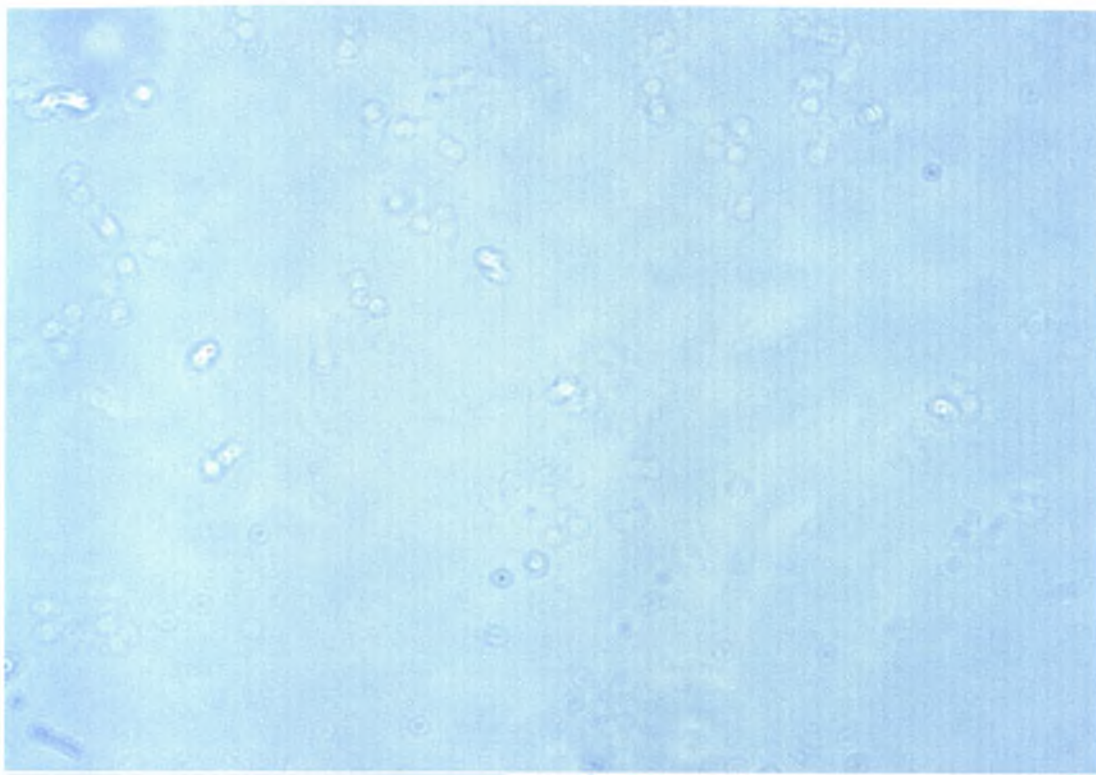
(δ)

Εικόνα 20 Ψηφιακή επεξεργασία φωτογραφίας σπερματοζωαρίων μετά από την διαδικασία χρώσης για τον εντοπισμό διασπασμένου DNA. Σπερματοζωάρια που εμφάνισαν άριστη εικόνα διατήρησης του DNA (α & β), και σπερματοζωάρια που εμφάνισαν διάσπαση του DNA και χρώση πέρα από τα όρια του πυρήνα των κυττάρων (γ) και (δ). Παρατηρούμε ότι διακρίνονται δύο διαφορετικοί και διακριτοί κύκλοι έντονου κόκκινου χρώματος, οι οποίοι υποδεικνύονται ο ένας με το κίτρινο και ο άλλος με το μπλέ βέλος. Στην εικόνα (γ), το κίτρινο βέλος υποδεικνύει σπερματοζωάριο με διασπασμένο DNA, το μπλε υποδεικνύει σπερματοζωάριο που δεν εμφάνισε διάσπαση του DNA. Στην εικόνα (δ), τα βέλη υποδεικνύουν την χρώση του πυρήνα (μπλε βέλος), καθώς και την χρώση εκτός πυρήνα (κίτρινο βέλος με διακεκομμένη γραμμή).. Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου X40

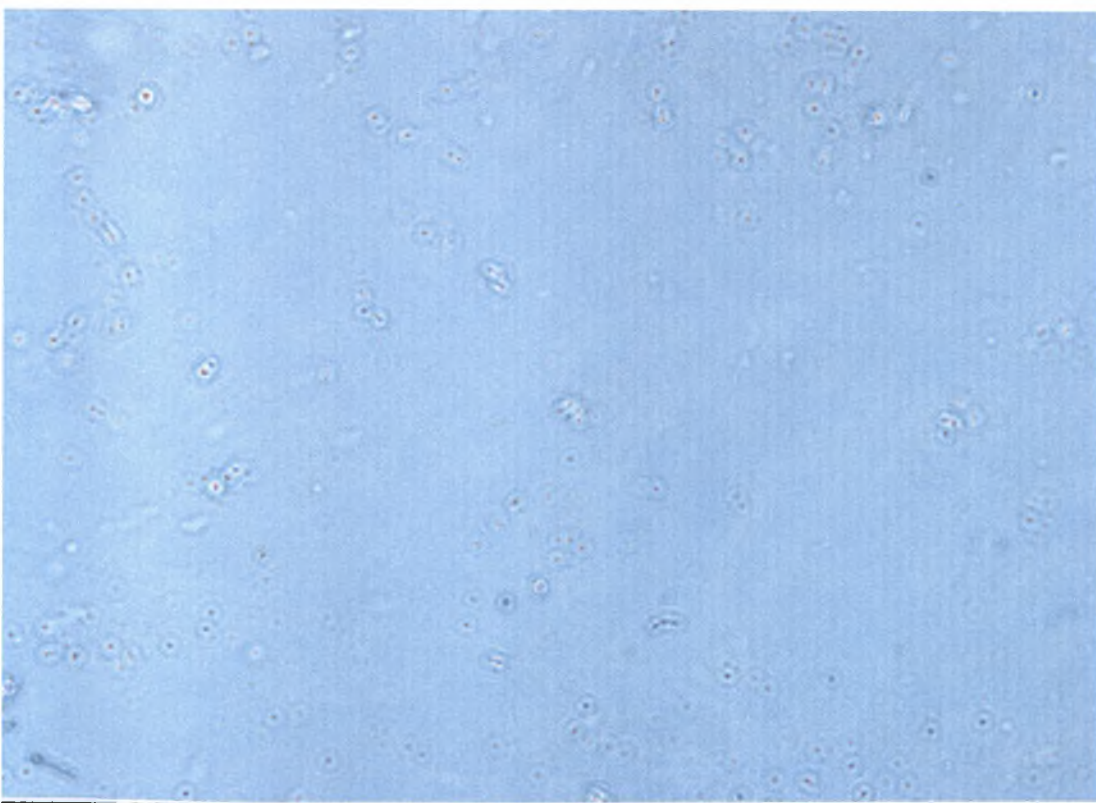
7. TRYPAN BLUE

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο μετά τη χρώση των δειγμάτων με Trypan Blue, εμφάνισαν ότι το σπέρμα που είχε κρυοδιατηρηθεί με όλα τα άλλα κρυοπροστατευτικά διαλύματα, εκτός του 10% DMSO και 10% Egg Yolk, είχε χρωματιστεί με το διάλυμα χρώσης, στο συντριπτικά μεγαλύτερο ποσοστό των σπερματοζωαρίων. Για αυτό το λόγο, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα με το κρυοπροστατευτικό διάλυμα που παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα, στο οποίο τα βιώσιμα σπερματοζωάρια, ήταν αρκετά και μπορεί έτσι να γίνει εκτίμηση του ποσοστού αυτών, σε σχέση με τον ολικό αριθμό των σπερματοζωαρίων. Επίσης, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα χρώσης του νωπού δείγματος σπέρματος λούτσου, για να γίνει εκτίμηση της επίδρασης της χρωστικής ουσίας στα βιώσιμα σπερματοζωάρια (Εικόνες 21, 22).

Από αυτές τις φωτογραφίες, φαίνεται ότι 2 sec μετά τη χρώση του δείγματος, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων, στα οποία έχει εισχωρήσει η χρωστική, κυμαίνεται περίπου στο 70% του ολικού αριθμού των σπερματοζωαρίων. Στη φωτογραφία 2 min μετά τη χρώση, το ποσοστό των «χρωματισμένων» σπερματοζωαρίων, έχει αυξηθεί ελάχιστα, ενώ από τις φωτογραφίες του φρέσκου σπέρματος πριν, αλλά και 30 sec μετά τη χρώση, φαίνεται, επίσης, ότι η χρωστική δεν προκαλεί αρνητικά αποτελέσματα στη βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων.

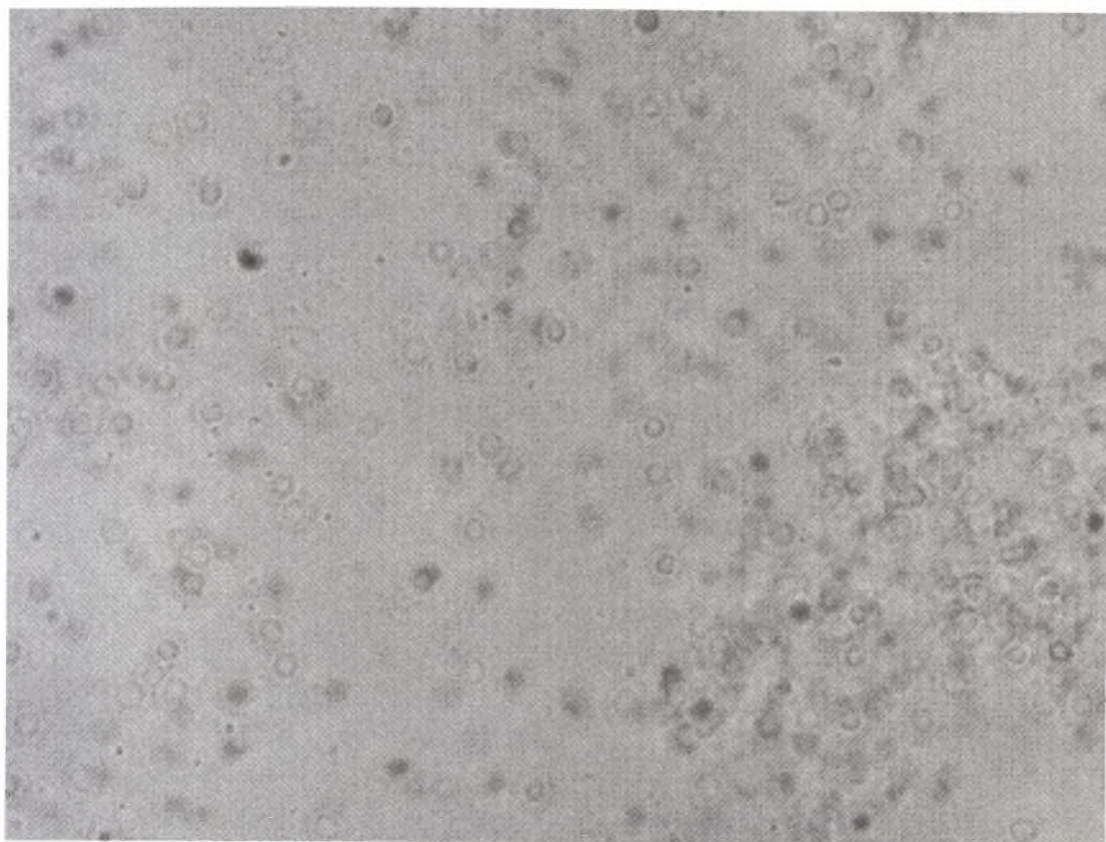


(α)

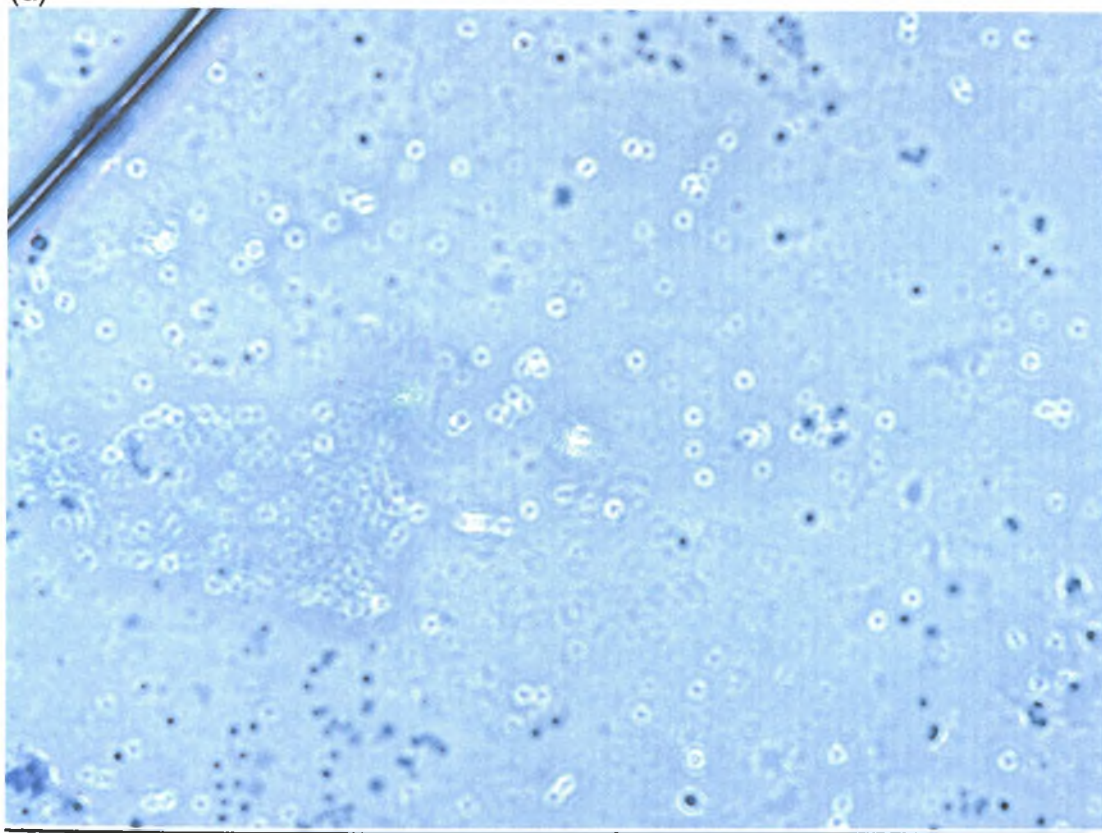


(β)

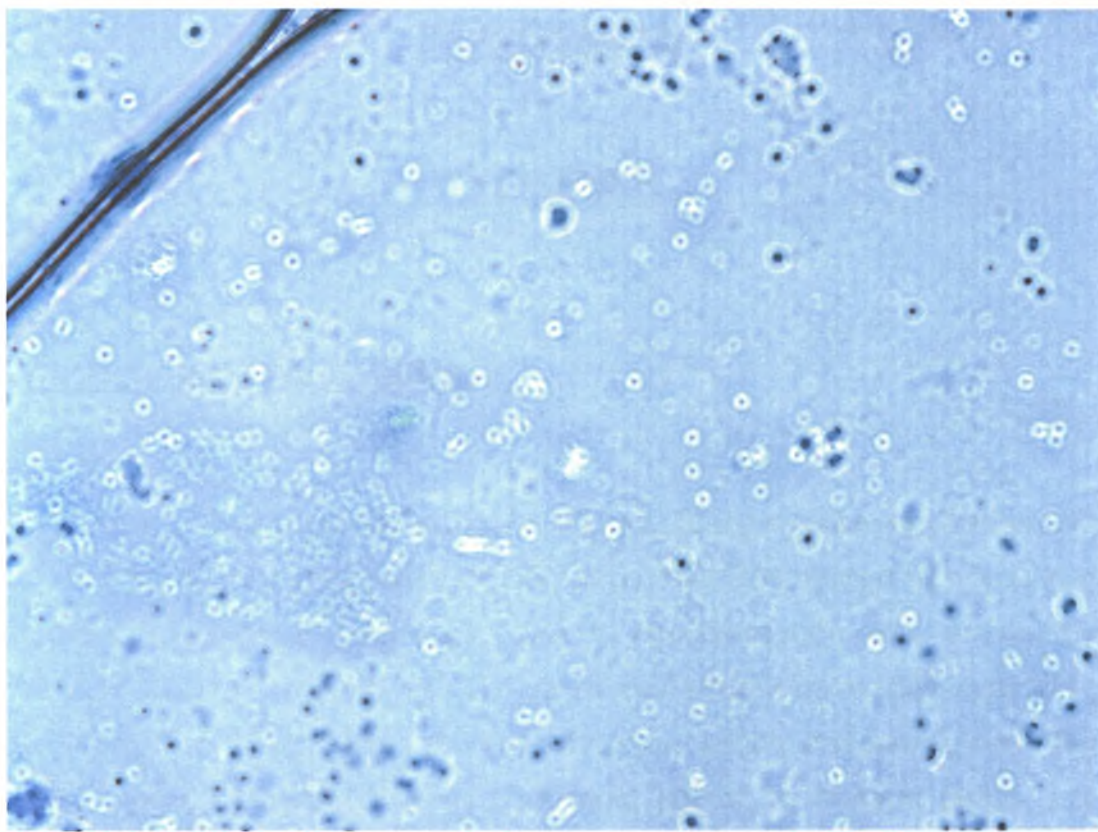
Εικ. 21 Φρέσκα σπερματοζώρια λούτσου (α) αμέσως μετά τη χρώση και (β) 30 sec μετά τη χρώση. Τα φρέσκα σπερματοζώρια του λούτσου, τα οποία δεν υπέστησαν τη διαδικασία κρυοδιατήρησης, δεν χρωματίστηκαν από την χρωστική. Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου X40



(α)



(β)



(γ)

Εικ. 22 Φωτογραφία οπτικού μικροσκοπίου αποψυγμένων σπερματοζωαρίων λούτσων (α) πριν την χρώση τους (β) 2 sec μετά τη χρώση τους και (γ) 2 min μετά τη χρώση τους. Παρατηρείται ότι ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό των σπερματοζωαρίων έχει χρωματιστεί, από το διάλυμα χρώσης. Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου X40

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία εφάρμοσε τεχνικές βραχυπρόθεσμης διατήρησης και κρυοδιατήρησης σπέρματος σε είδη στα οποία δεν υπάρχει προηγούμενη πληθώρα αναφορών (κέφαλος), ενώ η κρυοδιατήρηση του σπέρματος λούτσων είναι μια τεχνική για την οποία δεν εντοπίστηκαν βιβλιογραφικές αναφορές. Επίσης, σε αυτή την εργασία, έγινε χρήση σπέρματος από ήδη νεκρά άτομα, το οποίο συνιστά πρόκληση, καθώς το σπέρμα αυτών των ατόμων δεν είναι ποιοτικά ισότιμο με αυτό των ζωντανών ατόμων. Τέλος, εφαρμόστηκαν τεχνικές εκτίμησης ποιότητας σπέρματος (Commet Assay, Sperm Chromatin Dispersion Test, χρώση με Trypan Blue) οι οποίες έχουν μέλλον στις υδατοκαλλιέργειες και ιδιαίτερα η χρήση της Commet Assay εφαρμόστηκε σχετικά πρόσφατα στο σπέρμα ψαριών.

Η κινητικότητα είναι η παράμετρος που χρησιμοποιείται πιο συχνά για την εκτίμηση της ποιότητας του σπέρματος (Billard *et al.*, 1995; Bromage, 1995), θεωρείται προϋπόθεση για την γονιμότητα και σχετίζεται άμεσα με την επιτυχία αυτής (Rurangwa *et al.*, 2004; Adewumi *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007).

Στην παρούσα εργασία, ο υπολογισμός της κινητικότητας χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της ποιότητας των δειγμάτων σπέρματος που εξετάστηκαν. Ωριμα αρσενικά ψάρια δύο ειδών, λούτσοι και κέφαλοι, που αλιεύτηκαν με δικτυωτά αλιευτικά εργαλεία στην περιοχή του Αμβρακικού κόλπου και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο του ΤΕΙ Ηπείρου, στην Ηγουμενίτσα, όπου διενεργήθηκε το πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα. Η εκτίμηση της κινητικότητας αυτών των ψαριών, έδειξε ότι κινητικό σπέρμα είναι δυνατό να παραμένει σε αλιευμένα ψάρια, που υπέστησαν αυτές τις διαδικασίες.

Το ποσοστό κινητικότητας κυμάνθηκε από 20 – 30% έως 50 – 60% στα ψάρια που εξετάστηκαν (Πίν. 8) και αυτά τα αποτελέσματα κρίνονται ικανοποιητικά, δεδομένου του μεγάλου χρονικού διαστήματος που παρήλθε από την στιγμή της αλίευσης τους, μέχρι την μεταφορά τους στα Εργαστήρια του ΤΕΙ Ηπείρου, στην Ηγουμενίτσα και την προετοιμασία του σπέρματος για τις μετρήσεις. Καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά τα ποσοστά κινητικότητας, εμφάνισαν οι κέφαλοι (30 – 60%) από ότι οι λούτσοι (20 – 40%). Η διάρκεια της κινητικότητας κυμάνθηκε από 3 min, έως τα 7 min και 50 sec, ενώ τα αποτελέσματα ήταν καλύτερα στους κέφαλους (7:20 έως 7:50 min) από ότι στους λούτσους (περίπου 3 min), το οποίο, προφανώς, εξηγείται και από το μεγαλύτερο ποσοστό κινητικών σπερματοζωαρίων.

Ο γοναδικός δείκτης των κεφάλων ήταν επίσης, υψηλότερος από ότι στους λούτσους και αυτό μπορεί να θεωρηθεί ότι σχετίζεται με τα καλύτερα αποτελέσματα που παρουσίασαν οι κέφαλοι, όσον αφορά το ποσοστό κινητικότητας και τη διάρκεια της, λόγω της σχέσης μεταξύ του γοναδικού δείκτη και του σταδίου γεννητικής ωριμότητας των αρσενικών. Έτσι, στους κέφαλους ο γοναδικός δείκτης κυμάνθηκε από 4.8 έως 6.2%, ενώ στους λούτσους από 0.81 έως 3,2%.

Άλλωστε, στους λούτσους, παρόλο που ο γοναδικός δείκτης, δεν θεωρείται καθοριστικός παράγοντας της ποιότητας του σπέρματος, είναι πιθανόν να υπάρχει σε κάποιο βαθμό μία σχέση μεταξύ του γοναδικού δείκτη και της κινητικότητας του σπέρματος, όπως φαίνεται και από την γραμμή τάσης (Διάγρ. 3), κάτι το οποίο δεν εμφανίζεται στους κέφαλους. Αναλυτικά, στους λούτσους εμφανίζεται μια καλή συσχέτιση ($r=0.923$), αν και δεν αποδείχτηκε στατιστικά σημαντική ($p=0.07$), ενώ στους κέφαλους δεν υπήρχε καθόλου καλή συσχέτιση ($r=0.246$ και $p=0.28$)

Τα καλύτερα αποτελέσματα που συνολικά, εμφάνισαν οι κέφαλοι από ότι οι λούτσοι, όσον αφορά την ποιότητα του σπέρματος τους, μπορεί να εξηγηθεί από την καλύτερη κατάσταση των κεφάλων κατά την απόκτηση τους από τους αλιείς, καθώς αυτά τα ψάρια ήταν σε πληθώρα (η αλιεία των κεφάλων είναι ιδιαίτερα έντονη εκείνη την εποχή στον Αμβρακικό κόλπο) και επομένως ήταν πιο εφικτή η διαλογή των κατάλληλων αρσενικών (πιο διογκωμένη κοιλιακή χώρα κτλ), ενώ αντίθετα η απόκτηση ώριμων αρσενικών λούτσων ήταν πιο δύσκολη. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι τα διάφορα είδη

ψαριών εμφανίζουν βιολογικές διαφορές στην ποιότητα του σπέρματος και οι Rurangwa *et al.*, (2004) ανέφεραν ότι τα σπερματοζωάρια των ψαριών, επιδεικνύουν διαφορές ανά είδος, στην έναρξη, τη διάρκεια και την γενική εικόνα της κινητικότητας και για παράδειγμα, εντόπισαν διαφορές στην κινητικότητα των σολομοειδών και των κυπρινοειδών.

Είναι γνωστό από διάφορες έρευνες, ότι η λήψη σπέρματος υψηλής ποιότητας, είναι κρίσιμη για την επιτυχία της επεξεργασίας του σπέρματος (Koreika *et al.*, 2000), ενώ διάφοροι συγγραφείς έχουν αναφερθεί στις δυσμενείς επιπτώσεις του έντονου στρες, στην ποιότητα του σπέρματος των ώριμων αρσενικών ιχθύων (Noga *et al.*, 1994; Rurangwa *et al.*, 2004; Castranova *et al.*, 2005).

Παρόλα αυτά, οι Routray *et al.* (2006), ανέφεραν ότι δεν εντοπίστηκε σημαντική ανάπτυξη βακτηρίων στο σπέρμα, ακόμη και αρκετές ώρες από την θανάτωση του αρσενικού και τη λήψη του σπέρματος (μέχρι 8 ώρες), υποδεικνύοντας την αντιβακτηριακή ιδιότητα του σπερματικού πλάσματος, το οποίο, μερικώς, εξηγεί την διατήρηση της κινητικότητας στο σπέρμα των νεκρών ψαριών.

Στην παρούσα εργασία, μετά την παρατήρηση του σπέρματος στο οπτικό μικροσκόπιο και τον υπολογισμό του ποσοστού των κινητικών σπερματοζωαρίων και της έντασης και της διάρκειας της κίνησης τους, εκτιμήθηκε ότι το σπέρμα παρουσίαζε ικανοποιητική εικόνα για την διεξαγωγή πειραμάτων.

Η βραχυπρόθεσμη διατήρηση του σπέρματος, με την ψύξη αυτού στους 4° C είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται συχνά και που διευκολύνει διάφορες τεχνικές που εφαρμόζονται στις υδατοκαλλιέργειες, όπως την τεχνητή γονιμοποίηση και για να αντιμετωπιστούν προβλήματα, όπως του μη συγχρονισμού στην ωρίμανση και τη μεταφορά γαμετών (Tiersch, 2001; Koteleswaran & Pandian, 2002; Marques & Godinho, 2004).

Τα αποτελέσματα της βραχυπρόθεσμης κρυοσυντήρησης (σε 4°C) του σπέρματος των κεφάλων, με διάφορα κρυοπροστατευτικά διαλύματα, καθώς και με διάλυμα ακινητοποίησης, αλλά και του μη αραιωμένου σπέρματος, έδειξαν ότι το σπέρμα διατηρεί την βιωσιμότητα του σε αυτή τη θερμοκρασία για κάποιο χρονικό διάστημα, αλλά υπάρχει διαφορά στον χρόνο επιβίωσης των σπερματοζωαρίων, ανάλογα με την παρουσία διαλύματος

ακίνητοποίησης ή διάφορων κρυοπροστατευτικών διαλυμάτων. Προφανώς, οι κρυοπροστατευτικές ουσίες έχουν μία ευεργετική επίδραση στην προστασία του σπέρματος από την ψύξη, αλλά με το πέρασ κάποιου χρονικού διαστήματος και εξαιτίας της τοξικότητας τους, επιδρούν αρνητικά στην περαιτέρω βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων.

Αυτό επιβεβαιώθηκε στο πείραμα της κρυοσυντήρησης του σπέρματος των κεφάλων που συλλέχθηκε στο πεδίο με διάλυμα 10% DMSO και 10% λέκιθο αυγού και με διάλυμα ακίνητοποίησης (2^ο πείραμα), όπου το DMSO παρουσιάζει τοξική επίδραση στα σπερματοζωάρια (Διάγρ. 5). Αναλυτικότερα, από αυτό το διάγραμμα, φαίνεται ότι το συγκεκριμένο κρυοπροστατευτικό περιορίζει το ποσοστό των κινούμενων σπερματοζωαρίων, λόγω προφανώς των αρνητικών επιπτώσεων της τοξικότητας του, ενώ και το χρονικό διάστημα κατά τον οποίο τα σπερματοζωάρια διατηρούν την βιωσιμότητα τους, είναι μικρότερο από ότι αυτό του σπέρματος που αραιώθηκε με το διάλυμα ακίνητοποίησης.

Κατά το 1^ο πείραμα βραχυπρόθεσμης διατήρησης, το σπέρμα που τοποθετήθηκε στο ψυγείο παραμένοντας στους αναπαραγωγικούς αδένες των αρσενικών, παρόλο που μέχρι και 6 ώρες μετά την έναρξη του πειράματος, εμφάνισε αποτελέσματα σχεδόν ισότιμα με αυτά του νωπού σπέρματος, στη συνέχεια δεν εμφάνισε καμία κινητικότητα (24 ώρες μετά) (Πίν. 9). Αυτό είναι σύμφωνο με προηγούμενες μελέτες, καθώς έχει αναφερθεί ότι το σπέρμα που διατηρείτε σε μη αποστειρωμένο διάλυμα, δεν εμφανίζει κινητικότητα με το πέρασ μικρού χρονικού διαστήματος, εξαιτίας των αναερόβιων συνθηκών και της μικροβιακής μόλυνσης (Rurangwa *et al.*, 2004) και μόνο με την προσθήκη διάφορων extenders το σπέρμα διατηρεί την κινητικότητά του για σημαντικά μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Το διάλυμα ακίνητοποίησης έχει μια ξεκάθαρα θετική επίδραση στην βιωσιμότητα (Διάγρ. 5, Πίν. 9), προφανώς διότι η συγκέντρωση ιόντων σε αυτό το διάλυμα είναι βέλτιστη, για την επιβίωση των σπερματοζωαρίων (Tiersch, 2001). Πράγματι, το συγκεκριμένο διάλυμα ακίνητοποίησης (CryoFish-*imv*. France), παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα στην βραχυπρόθεσμη διατήρηση του σπέρματος του κεφάλου, σε σύγκριση με όλα τα κρυοπροστατευτικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν (Πίν. 9, Διάγρ. 4, 5).

Συγκεκριμένα, στο σπέρμα που αραιώθηκε με διάλυμα ακινητοποίησης, παρατηρήθηκε κινητικότητα σπέρματος ακόμη και 5 ημέρες από της έναρξη του πειράματος, ενώ και την 7^η ημέρα υπήρχε μια πολύ μικρή κίνηση, η οποία όμως πιο σωστό είναι να περιγραφεί ως ταλάντωση κάποιων σπερματοζωαρίων (Πίν. 9). Επίσης, με αυτό το διάλυμα το ποσοστό κινητικότητας και η διάρκεια της κίνησης, ήταν σταθερά υψηλά ακόμη και 30 ώρες από την έναρξη του πειράματος.

Οι διαφορές που εμφανίζονται στην περίοδο βραχυπρόθεσμης διατήρησης των κεφάλων στο πρώτο και δεύτερο πείραμα, πιθανώς οφείλεται στη διαφορετική ποιότητα σπέρματος από άτομο σε άτομο που παρουσιάζουν τα ψάρια, όπως αναφέρουν οι Taborsky (1998) και Rurangwa *et al.* (2004), αλλά και σε πιθανά λάθη κατά τη λήψη του σπέρματος (π.χ. επιμόλυνση του σπέρματος με ούρα) ή κατά τη διάρκεια της μέτρησης της κινητικότητας.

Το κρυοπροστατευτικό διάλυμα που περιείχε 10% διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και 10% λέκιθο αυγού κότας (Egg Yolk), παρουσίασε αρκετά καλά αποτελέσματα, καθώς μέχρι και την 5^η ημέρα, εμφανίστηκε κίνηση σε ορισμένα σπερματοζωάρια (5%), ενώ μέχρι τις 30 ώρες τα αποτελέσματα ήταν αρκετά καλά (Πίν. 9). Αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα που βρήκαν οι Ji *et al.* (2004), οι οποίοι υποστήριξαν ότι το DMSO, παρόλο που θεωρείται τοξικό για τα περισσότερα είδη κυττάρων, μπορεί να διατηρήσει τη βιωσιμότητα του σπέρματος για κάποιο χρονικό διάστημα, σε διάφορα είδη ψαριών. Αντίθετα, οι Ogier de Baulny *et al.* (1996), ανέφεραν ότι όταν η συγκέντρωση του DMSO υπερβαίνει το 5%, η διάρκεια της κινητικότητας στα σπερματοζωάρια του *Lates calcarifer* μειώθηκε.

Τα διαλύματα που περιείχαν 10% μεθανόλη (Methanol) και 10% αιθυλενογλυκόλη (Ethylene Glycol), δεν εμφάνισαν κινητικότητα στο σπέρμα την 5^η ημέρα, ενώ και τα αποτελέσματα που λήφθηκαν 30 ώρες μετά την έναρξη του πειράματος, δεν ήταν ικανοποιητικά (Πίν. 9).

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με άλλες μελέτες, οι οποίες καταδείκνυαν τα τοξικά αποτελέσματα των κρυοπροστατευτικών (Chao *et al.*, 1997; Suquet *et al.*, 2000; Koteeswaran & Pandian, 2002; Sansone *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006), το οποίο όμως εξαρτάται από τη συγκέντρωση αυτών (Leung & Jamieson, 1991).

Έχει επίσης αναφερθεί, ότι η διατήρηση του σπέρματος για μικρά χρονικά διαστήματα, μπορεί να είναι εφικτή κατά την αποθήκευση του σε γυάλινα δοχεία, σε θερμοκρασία περίπου 4 - 5° C, όπως έχει επισημανθεί και από τον Πάσχο (2004), ενώ οι Rurangwa *et al.* (2004), πρόσθεσαν ότι αυτό οφείλεται στον χαμηλό μεταβολισμό του σπέρματος, αλλά για την περαιτέρω διατήρηση, το σπέρμα πρέπει να αραιωθεί με κάποιο extender, το οποίο στην παρούσα εργασία ήταν το CryoFish. Η δράση των extenders στη διατήρηση του σπέρματος σε αυτές τις θερμοκρασίες, έχει γίνει ήδη γνωστή από άλλους συγγραφείς (Christensen & Tiersch, 1996; Rurangwa *et al.*, 2004; Babiak *et al.*, 2004).

Σε άλλα είδη ψαριών έχουν αναφερθεί αποτελέσματα διατήρησης του σπέρματος σε θερμοκρασία 4° C, έως και 21 ημέρες, με τη χρήση του κατάλληλου διαλύματος αραιώσης σπέρματος (Christensen & Tiersch, 1996) ή ακόμη και 10 ημέρες, χωρίς την προσθήκη τέτοιου διαλύματος (Rurangwa *et al.*, 2004). Όμως είναι γνωστό, ότι τα αποτελέσματα διαφέρουν από είδος σε είδος και ανάλογα με τις συνθήκες κρυοσυντήρησης του σπέρματος και την ποιότητα του σπέρματος πριν την διατήρηση του.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, γίνεται σαφές ότι για την βραχυπρόθεσμη διατήρηση του σπέρματος νεκρών κεφάλων στους 4°C, το διάλυμα ακινητοποίησης CryoFish-imv.France, σε αναλογία 1:3 με το σπέρμα (σπέρμα:διάλυμα, v:v) παρουσιάζει ικανοποιητικά αποτελέσματα και επομένως η χρησιμοποίησή του προτείνεται για αυτό τον σκοπό.

Η κρυοδιατήρηση του σπέρματος, θεωρείται σήμερα μια πολύ σημαντική μέθοδος διατήρησης γενετικού υλικού και δημιουργίας τράπεζας γονιδίων στα ψάρια. Η χρήση της επεκτείνεται, καθώς τα πρωτόκολλα κρυοδιατήρησης βελτιώνονται και προσαρμόζονται στις απαιτήσεις του σπέρματος διάφορων ειδών ψαριού. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης κρυοδιατηρημένου σπέρματος έχουν αναφερθεί από διάφορους συγγραφείς, και μεταξύ άλλων ο συγχρονισμός της διαθεσιμότητας των γαμετών (Ogier de Baulny *et al.*, 1997; Babiak *et al.*, 2002; Sunarma *et al.*, 2007), η μείωση του κόστους διατήρησης των γεννητόρων (Lahnsteiner *et al.*, 1998; Richardson *et al.*, 1999; Rurangwa *et al.*, 2004), η προστασία από μετάδοση ασθενειών (Rana, 1995; Dreanno *et al.*, 1997; Πάσχος, 2004), ενώ η κρυοδιατήρηση του σπέρματος που συλλέχθηκε από νεκρά ψάρια, μπορεί να αποδειχθεί κρίσιμη

για την διατήρηση ειδών και την επαναφορά τους, κατά τη διάρκεια μιας οικολογικής καταστροφής (Koteeswaran and Pandian, 2002; Routray *et al.* , 2006).

Και στα δύο είδη ψαριών, στο σπέρμα των οποίων διεξήχθη το πείραμα της κρυοδιατήρησης, τα αποτελέσματα έδειξαν την προστατευτική δράση των κρυοπροστατευτικών ουσιών DMSO και λέκιθο αυγού, σε συγκεντρώσεις 10% έκαστο και επιβεβαιώθηκε η υπεροχή αυτού του διαλύματος έναντι των υπολοίπων που χρησιμοποιήθηκαν.

Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν στο πείραμα της κρυοδιατήρησης του σπέρματος των λούτσων, αποδείχθηκε ότι το κρυοπροστατευτικό διάλυμα συγκέντρωσης 10% λέκιθο αυγού και 10% DMSO, είναι το καταλληλότερο για την κρυοπροστασία του σπέρματος των λούτσων, σε σχέση με τα υπόλοιπα που χρησιμοποιήθηκαν. Αντίθετα, τα διαλύματα με 10% λέκιθο αυγού και 0% DMSO, καθώς και με 2.5% λέκιθο αυγού και 2.5% DMSO, δεν παρέχουν καμία προστασία στο σπέρμα, καθώς αυτό, μετά την απόψυξη του, δεν παρουσίασε καμία κινητικότητα, ενώ επίσης και τα κρυοπροστατευτικά με συγκέντρωση 10% λέκιθο αυγού και 5 % DMSO, 10% λέκιθο αυγού και 2.5% DMSO, 5 % λέκιθο αυγού και 5 % DMSO, δεν κρίνονται κατάλληλα για την κρυοδιατήρηση του σπέρματος αυτών των ψαριών, παρόλο που ένα μικρό ποσοστό των σπερματοζωαρίων παρουσίασε κάποια κινητικότητα μετά την απόψυξη τους (Πίν. 8).

Τα αποτελέσματα που εμφανίστηκαν, μετά την απόψυξη του σπέρματος των κεφάλων που κρυοδιατηρήθηκε με την προσθήκη διάφορων κρυοπροστατευτικών, απέδειξε ότι το διάλυμα που περιέχει 10% DMSO και 10% λέκιθο αυγού, είναι το καταλληλότερο για την κρυοδιατήρηση του σπέρματος αυτών των ψαριών, έναντι του διαλύματος 10% μεθανόλης και αυτού με 10% αιθυλενογλυκόλης (EG), καθώς εμφάνισε κινητικότητα στο 20-30% των αποψυγμένων σπερματοζωαρίων και η κίνηση τους ήταν αρκετά έντονη και με ικανοποιητική ταχύτητα κολύμβησης, ενώ, όπως ήταν αναμενόμενο, το διάλυμα ακινητοποίησης δεν παρείχε καμία προστασία στα σπερματοζωάρια κατά την κρυοδιατήρηση τους.

Το αποψυγμένο σπέρμα που κρυοδιατηρήθηκε με διάλυμα EG, δεν εμφάνισε καμία κίνηση και άρα αυτό το κρυοπροστατευτικό είναι ακατάλληλο για την κρυοδιατήρηση του σπέρματος αυτών των ψαριών. Τέλος, το σπέρμα

που κρυοδιατηρήθηκε με διάλυμα μεθανόλης παρουσίασε πολύ μικρή κινητικότητα μετά την απόψυξη του, οπότε και η χρήση αυτού του κρυοπροστατευτικού δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ικανοποιητική (Πίν. 12).

Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά των Chereguini *et al.* (1997), οι οποίοι περιέγραψαν την επιτυχή κρυοδιατήρηση του σπέρματος των ψαριών *Scophthalmus maximus* με διάλυμα κρυοδιατήρησης που περιέχει 10% λέκιθο αυγού και 10% DMSO, ενώ παρόμοιες αναφορές έχουν γίνει και από τους Harvey (1983); Horváth & Urbányi (2000) και Maria *et al.* (2006). Επίσης, ως προτεινόμενη συγκέντρωση του DMSO, αυτή του 10%, ανέφεραν οι Richardson *et al.* (1995), για το *Pleuronectes ferrugineus*, οι Dreanno *et al.* (1997) για το *Scophthalmus maximus* και οι Maisse *et al.* (1988) για την ιριδίζουσα πέστροφα.

Η καταλληλότητα του DMSO έναντι άλλων κρυοπροστατευτικών, έχει περιγραφεί από πολλούς συγγραφείς και οι Horvath *et al.* (2003) ανέφεραν ότι έχει χρησιμοποιηθεί για την κρυοδιατήρηση σπέρματος πάρα πολλών θαλασσινών ειδών ψαριού, όπως στο καλκάνι (Dreanno *et al.*, 1997), το λαβράκι (Fauvel *et al.*, 1998) και στα *Mycteroperca bonaci* και *Mycteroperca microlepis* (Richardson *et al.*, 1999), αλλά και σε ψάρια του γλυκού νερού, όπως στον κυπρίνο (Horváth *et al.*, 2003). Η επιτυχία του DMSO σαν κρυοπροστατευτικό, πιθανόν οφείλεται στην γρήγορη διείσδυση του μέσα στα κύτταρα (Liu *et al.*, 2006) και στην αλληλεπίδραση του με τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης του σπέρματος (Ogier de Baulny *et al.*, 1996).

Οι Horváth & Urbányi (2000), ανέφεραν ότι η χρήση του DMSO, παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με το EG και την μεθανόλη, για την κρυοδιατήρηση του σπέρματος του Αφρικάνικου γατόψαρου, όμως οι Aoki *et al.* (1997), ανέφεραν ότι το διάλυμα 10% DMSO, ήταν κατώτερο του DMF (N- διμεθυλοφορμαλδεΐδη), στην κρυοδιατήρηση του σπέρματος των *Oryzias latipes* (Harvey, 1983), ενώ η μεθανόλη βρέθηκε ανώτερη του DMSO στην προστασία του σπέρματος του κοινού κυπρίνου (Horváth *et al.*, 2003). Η αιθυλενογλυκόλη (EG), έδωσε μέτρια αποτελέσματα στα Atlantic croaker και στο yellowfin seabream (Suquet *et al.*, 2000).

Το ότι τα κρυοπροστατευτικά, παρουσιάζουν διαφορετικά αποτελέσματα στην κρυοδιατήρηση του σπέρματος διάφορων ειδών ψαριού, είναι ευρέως γνωστό και για αυτό το λόγο η χρήση ενός κρυοπροστατευτικού

διαλύματος, επιβεβαιώνεται μόνο από την χρήση του σε κάποιο είδος ψαριού (Chao *et al.*, 1997; Sansone *et al.*, 2003; Melo & Godinho, 2006). Επίσης, είναι γνωστό ότι η διάρκεια της αποθήκευσης του σπέρματος πριν την κρυοδιατήρηση, μπορεί να επηρεάσει την επιτυχία αυτής και για αυτό το λόγο οι γαμέτες πρέπει να καταψύχονται αμέσως μετά την συλλογή τους (Rana, 1995). Επομένως, καθυστέρηση που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία, ίσως να ήταν ένας περιοριστικός παράγοντας στην μεγαλύτερη επιτυχία της κρυοδιατήρησης και πιθανόν τα αποτελέσματα να ήταν ακόμα καλύτερα, αν γίνονταν αμέσως η συλλογή και η κατάψυξη του σπέρματος.

Σε αυτή την εργασία επιβεβαιώθηκαν οι αναφορές άλλων συγγραφέων, για την δυνατότητα επιτυχούς κρυοδιατήρησης του σπέρματος νεκρών ψαριών, καθώς οι Koteeswaran & Pandian (2002), έχουν αναφέρει την επιτυχή κρυοδιατήρηση του σπέρματος νεκρών ατόμων *Heteropneustes fossilis* (Bloch, 1794) και οι Routray *et al.* (2006) ανέφεραν την επιτυχία της διαδικασίας, για το σπέρμα που συλλέχθηκε μετά το θάνατο ατόμων *Labeo rohita* (Hamilton, 1822).

Κατά την κρυοδιατήρηση του σπέρματος από νεκρά άτομα κεφάλων και λούτσων, το κρυοπροστατευτικό διάλυμα 10% DMSO και 10% λέκιθου αυγού, παρουσίασε ικανοποιητικά αποτελέσματα και επομένως το πρωτόκολλο κρυοδιατήρησης, κατά το οποίο έγινε ανάμιξη σπέρματος και αυτού του κρυοπροστατευτικού διαλύματος, σε αναλογία 1:3 (σπέρμα:διάλυμα, v:v) προτείνεται για την επιτυχή κρυοδιατήρηση σπέρματος νεκρών ατόμων κέφαλων και λούτσων.

Είναι γνωστό ότι η κρυοδιατήρηση προκαλεί βλάβη στα σπερματοζωάρια, σαν αποτέλεσμα της συσσωρευμένης ζημιάς των κυττάρων, η οποία προκαλείται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κατάψυξης - απόψυξης (Parks & Graham, 1992; Rana, 1995; O'Connell *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006). Αυτές οι ζημιές οφείλονται, κυρίως, στην προσθήκη των κρυοπροστατευτικών πριν την κατάψυξη, στις ογκομετρικές μετατροπές και στην συρρίκνωση της μεμβράνης, εξαιτίας του υπεροσμωτικού διαλύματος του κρυοπροστατευτικού, καθώς επίσης και στην, προκαλούμενη από την κατάψυξη, αφυδάτωση (Parks & Graham, 1992). Η διαδικασία της κρυοδιατήρησης προκαλεί μορφολογικές μετατροπές, φθορές στη φυσιολογία, βιοχημικές και μεταβολικές αλλαγές, αλλά και ζημιά στο DNA του σπέρματος,

η οποία σχετίζεται με μια σειρά αρνητικών επιπτώσεων στην λειτουργικότητα και τη δυνατότητα γονιμοποίησης αυτού (Babiak *et al.*, 1997; Cabrita *et al.*, 2004; Zilli *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006).

Σήμερα, οι τεχνικές ανίχνευσης της ζημιάς στο DNA του σπέρματος, χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο (Larson *et al.*, 2000; Fernantez *et al.*, 2003), καθώς η ακεραιότητα του πατρικού DNA, είναι καίριας σημασίας για την περαιτέρω ανάπτυξη ενός εμβρύου (Cabrita *et al.*, 2004).

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές για την ανίχνευση της ζημιάς και την εκτίμηση της βιωσιμότητας στο αποψυγμένο σπέρμα, όπως η Comet Assay, η χρώση με Trypan Blue και η τεχνική διασποράς της χρωματίνης του σπέρματος (Sperm Chromatin Dispersion Test). Οι τεχνικές της χρώσης με Trypan Blue και η Sperm Chromatin Dispersion, χρησιμοποιούνται αρκετά συχνά στο σπέρμα των ψαριών και διάφοροι ερευνητές έχουν αναφερθεί στην χρησιμότητά τους στο κατεψυγμένο – αποψυγμένο σπέρμα (Freshney 1987; Evenson *et al.*, 1999; Ankem *et al.*, 2002; Cabrita *et al.*, 2004), ενώ η Comet Assay, παρόλο που είναι μια τεχνική σχετικά νέα για το σπέρμα των ψαριών, θεωρείται πολύ σημαντική για την ανίχνευση της ζημιάς στο DNA των σπερματοζωαρίων (Ostling & Johanson, 1984; Singh *et al.*, 1988; Barbouti *et al.*, 2001).

Και οι τρεις αυτές τεχνικές, εμφάνισαν σε κάποιο βαθμό την ζημιά που προκάλεσε η κρυοδιατήρηση στο σπέρμα των λούτσων και κέφαλων και κατέδειξαν τα διαφορετικά αποτελέσματα της κρυοπροστασίας των διάφορων κρυοπροστατευτικών που χρησιμοποιήθηκαν.

Η Comet Assay, είναι μια τεχνική η οποία χρησιμοποιείται εδώ και αρκετά χρόνια για την μελέτη ανθρώπινων κυττάρων, αλλά για την εφαρμογή της σε σπερματοζωάρια ψαριών, χρειάστηκαν αρκετές τροποποιήσεις σε κάποια σημεία του πρωτοκόλλου.

Μετά την εύρεση του κατάλληλου αριθμού κυττάρων ανά δείγμα, τα οποία πρέπει να επιλεγούν, ώστε οι πυρήνες τους να μην αλληλοεπικαλύπτονται, έγινε εφικτή η παρατήρηση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο και εμφανίστηκαν οι διαφορές στην προκαλούμενη ζημιά στο DNA των σπερματοζωαρίων, ανάλογα με την προστασία που παρείχαν τα διάφορα κρυοπροστατευτικά και επιβεβαιώθηκε η υπεροχή του διαλύματος 10% λέκιθο αυγού και 10% DMSO, έναντι των υπολοίπων.

Παρόλα αυτά, τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν δεν ήταν αρκετά για να γίνει στατιστική ανάλυση, η οποία να υποστηρίξει τα αποτελέσματα, επομένως θα χρειαστεί μεγαλύτερη εξάσκηση στην πραγματοποίηση αυτού του πειράματος στα σπερματοζωάρια των ψαριών.

Η τεχνική Sperm Chromatin Dispersion στην παρούσα εργασία, εφαρμόστηκε στο αποψυγμένο σπέρμα των κεφάλων και από την παρατήρηση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο, βρέθηκε ότι τα αποτελέσματα αυτής της τεχνικής συμφωνούν με αυτά, κατά την εκτίμηση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων, στο ότι το διάλυμα DMSO 10% και λέκιθο αυγού 10%, πλεονεκτεί έναντι των άλλων δύο (μεθανόλη και EG) για την κρυοδιατήρηση του σπέρματος αυτών των ψαριών (Εικ 20).

Μετά τη χρώση των δειγμάτων με Trypan Blue, η παρατήρηση των εικόνων, οι οποίες λαμβάνονται πριν και μετά την χρώση του σπέρματος, φανερώνουν το ποσοστό των βιώσιμων σπερματοζωαρίων, αλλά και την ακεραιότητα της μεμβράνης του σπέρματος και, επομένως την επιτυχία της κρυοδιατήρησης (Ho Kang *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). Πάντως, οι Rurangwa *et al.* (2004) ανέφεραν ότι αυτές οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται, ώστε απλά να εμφανίσουν την ακεραιότητα της μεμβράνης του σπέρματος, παρά την πραγματική βιωσιμότητα, επειδή και το άθικτο σπέρμα μπορεί επίσης, να έχει περιορισμένη βιωσιμότητα.

Στην παρούσα εργασία, επίσης, έγινε χρώση των δειγμάτων αποψυγμένου, αλλά και φρέσκου σπέρματος λούτσων και παρουσιάζονται οι φωτογραφίες της χρώσης του φρέσκου, αλλά και του δείγματος σπέρματος που κρυοδιατηρήθηκε, μετά την αραίωση του με το διάλυμα 10% DMSO και 10% λέκιθο αυγού, το οποίο είχε σχετικά καλά αποτελέσματα, καθώς η χρήση των άλλων κρυοπροστατευτικών διαλυμάτων δεν παρείχε σχεδόν καμία προστασία στα κρυοδιατηρημένα σπερματοζωάρια. Από την παρατήρηση αυτών των φωτογραφιών, εκτιμάται ότι 2 δευτερόλεπτα μετά τη χρώση του δείγματος, το ποσοστό των σπερματοζωαρίων, στα οποία έχει εισχωρήσει η χρωστική, κυμαίνεται περίπου στο 70% του ολικού αριθμού των σπερματοζωαρίων (Εικ. 22) και αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά που λήφθηκαν, κατά την εκτίμηση της κινητικότητας αυτού του δείγματος αποψυγμένου σπέρματος. Στη φωτογραφία 2 λεπτά μετά τη χρώση, το ποσοστό των «χρωματισμένων» σπερματοζωαρίων, έχει αυξηθεί ελάχιστα και

φαίνεται, έτσι, ότι η χρωστική δεν προκαλεί επιπρόσθετη απώλεια βιωσιμότητας στα αποψυγμένα σπερματοζωάρια σε αυτό το χρονικό διάστημα. Από τις φωτογραφίες του φρέσκου σπέρματος πριν, αλλά και 30 δευτερόλεπτα μετά τη χρώση (Εικ. 21), φαίνεται, επίσης, ότι η χρωστική δεν προκαλεί αρνητικά αποτελέσματα στη βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων, σε τόσο σύντομο χρονικό διάστημα.

Συμπερασματικά, είναι πιθανόν να εμφανισθούν καλύτερα αποτελέσματα με την άμεση συλλογή σπέρματος και κατάψυξης των σπερματοζωαρίων, όσον αφορά την εκτίμηση της ποιότητας του κατεψυγμένου – αποψυγμένου σπέρματος, αλλά παρόλα αυτά, τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν επέτρεψαν να συνδυαστούν εργαστηριακές μετρήσεις που δεν είναι εφικτό να γίνουν στο αλιευτικό πεδίο, ενώ τα αποτελέσματα είναι αρκετά ενθαρρυντικά και αξιόπιστα.

Με την ανάπτυξη των τεχνικών εκτίμησης ποιότητας σπέρματος και παράλληλα τον πειραματικό προσδιορισμό ορισμένων πολύ γνωστών κρυοπροστατευτικών διαλυμάτων, είναι πλέον δυνατόν, να πραγματοποιηθούν πειραματικές εκτιμήσεις της ποιότητας του σπέρματος των ιχθύων, με εφαρμογές σε αλιευτικά πεδία και σε ιχθυογεννητικούς σταθμούς.

Για παράδειγμα, με τις μεθοδολογικές προσεγγίσεις που παρουσιάσθηκαν, θα είναι εφικτό να γίνει εκτίμηση της ποιότητας σπέρματος “άγριων” γεννητόρων για χρήση σε ιχθυογεννητικούς σταθμούς ή για την εκτίμηση της κατάστασης ενός πληθυσμού. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν κάποια σημαντική διαφορά όσον αφορά την πρακτικότητα της κάθε μεθοδολογίας, είναι όμως λογικό να είναι πιο πρακτική η εφαρμογή των μεθόδων εκτίμησης ποιότητας σπέρματος (φρέσκου ή κρυοδιατηρημένου) που απαιτούν ελάχιστο εργαστηριακό εξοπλισμό.

Έτσι, είναι πιο πιθανόν να εφαρμοστεί εύκολα η τεχνική ανάλυσης διασποράς της χρωματίνης (Sperm Chromatin Dispersion Test), σε σύγκριση με την τεχνική Comet assay, με εξοπλισμό που περιλαμβάνει απλά ένα μικροσκόπιο φθορισμού. Ακόμα πιο πρακτικό, είναι να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός των νεκρών σπερματοζωαρίων μετά τη χρώση αυτών με Trypan Blue.

Σύμφωνα με αυτά, είναι επιθυμητό να γίνει μια εκτίμηση της βιωσιμότητας των σπερματοζωαρίων με ανάλυση κινητικότητας και με χρώση με Trypan Blue, είναι όμως πιθανόν να υπάρχουν ζωντανά σπερματοζωάρια που έχουν υποστεί ζημιές στην δομή του DNA. Σε μία τέτοια περίπτωση, είναι προτιμότερο να γίνει εκτίμηση της δομής του DNA, με τεχνική ανάλυσης διασποράς της χρωματίνης.

Είναι, παρόλα αυτά, εύκολα αντιληπτό, ότι το επίπεδο αξιοπιστίας μιας τεχνικής εκτίμησης ποιότητας σπέρματος αυξάνεται, καθώς επιστρατεύεται πιο αναπτυγμένη μεθοδολογία και εξοπλισμός και επομένως, η τεχνική Comet Assay, μπορεί να προσφέρει νέες προοπτικές στις τεχνικές εκτίμησης της ποιότητας σπέρματος.

Συνοπτικά, τα κυριότερα από τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτή την διπλωματική εργασία είναι :

- Είναι εφικτό να συλλέξουμε καλής ποιότητας σπέρμα από εμπορικά είδη θαλασσινών ψαριών. Πειραματικές εργασίες μπορούν εύκολα να πραγματοποιηθούν, ακόμη και αρκετές ώρες μετά την αλίευση των ψαριών λούτσοι και κέφαλοι
- Η χρήση διαλύματος ακινητοποίησης σπέρματος βελτιώνει τα αποτελέσματα της βραχυπρόθεσμης διατήρησης (4°C) του σπέρματος των ειδών που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία (*M. cephalus* και *S. sphyraena*) και η βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων αυτών των ψαριών, μπορεί να διατηρηθεί μέχρι και πέντε ημέρες μετά την έναρξη του πειράματος, ενώ και επτά ημέρες μετά, υπήρχε κάποια υποτυπώδης κίνηση σε ορισμένα σπερματοζωάρια. Η χρήση του DMSO φανέρωσε τα δυνητικά τοξικά αποτελέσματα αυτού του ευρέως χρησιμοποιούμενου κρυοπροστατευτικού. Παρόλα αυτά, αυτή η τοξικότητα η οποία έγινε εμφανής μετά από τη διατήρηση του για 1 ώρα στους 4°C, δεν αποτρέπει τη χρήση του DMSO σαν κρυοπροστατευτικό για την βραχυπρόθεσμη συντήρηση σπέρματος.

- Παρομοίως ενθαρρυντικά ήταν τα αποτελέσματα των πειραμάτων κρυοδιατήρησης του σπέρματος, με την επικράτηση του διαλύματος DMSO και λέκιθο αυγού, σε τελική συγκέντρωση 10% έκαστο, σαν κρυοπροστατευτικό παράγοντα.
- Οι τεχνικές χρώσης του σπέρματος με Trypan Blue και η τεχνική Ανάλυσης της διασποράς χρωματίνης των Σπερματοζωαρίων (Sperm Chromatin Dispersion Test), μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ελάχιστο εργαστηριακό εξοπλισμό και να παρέχουν πειραματικές εκτιμήσεις της ποιότητας του σπέρματος των ιχθύων, με εφαρμογές σε αλιευτικά πεδία και σε ιχθυογεννητικούς σταθμούς.
- Η τεχνική Comet Assay, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο σπέρμα ιχθύων για την ανίχνευση της ζημιάς στο DNA των σπερματοζωαρίων, μετά από κάποιες προσαρμοστικές αλλαγές στο πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για τα ανθρώπινα κύτταρα, και να αυξήσει τα επίπεδα της αξιοπιστίας στην εκτίμηση της ποιότητας σπέρματος, χρησιμοποιώντας πιο αναπτυγμένη μεθοδολογία και εξοπλισμό.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adewumi A.A., Olaleye V.F., Adesulu E.A, 2005. Egg and Sperm Quality of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell) Broodstock Fed Differently Heated Soybean-based Diets. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(1), pp. 17–22.
- Alavi S. M. H., Cosson J., 2005. Sperm motility and fertilizing ability in the Persian sturgeon *Acipenser persicus*. *Aquaculture Research*, 36, pp. 841 – 850.
- Allyn, M.L., Sheehan, R.J., Kohler C.C., 2001. The effects of capture and transportation stress on white bass semen osmolarity and their alleviation via sodium chloride. *Transactions of the American Fisheries Society*, 130, pp. 706– 711.
- Altunok M., Muller-Belecke A., Horstgen-Schwark G., 2004. Cryopreservation of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Sperm. Deutscher Tropentag, Berlin “Rural Poverty Reduction through Research for Development”.
- Anchordoguy T.J., Cecchini C.A., Crowe J.H., Crowe L.M., 1991. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers. *Cryobiology*, 28(5), pp. 467–73.
- Ankem M.K., Mayer E., Ward W.S., Cummings K.B., Barone J.G., 2002. Novel assay for determining DNA organization in human spermatozoa: implications for male factor infertility. *Urology*, 59, pp.575 -578.
- Aoki K., Okamoto M., Tatsumi K., Ishikawa Y., 1997. Cryopreservation of Medaka Spermatozoa. *Zoological science*, 14 (4), pp. 641–644.
- Astuarino, J.F., Sorbera L.A., Carrillo M., Zanuy S., Ramos J., Navarro J.C., Bromage N., 2006. Reproductive performance in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) fed two PUFA-enriched experimental diets: a comparison with males fed a wet diet. *Aquaculture*, 194, pp.173–190.
- Babiak I., Glogowski J., Luczynski M.J., Luczynski M., 1997. Effect of individual male variability on cryopreservation of northern pike, *Esox lucius* L., sperm. *Aquaculture Research*, 28 (3), pp.191–197.

- Babiak I., Glogowski J., Luczynski M.J., Goryczko K., Dobosz S., Kuzminski H., 1998. The effect of individual male potency on fertilization ability of fresh and cryopreserved milt of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 29(5), pp.337–340.
- Babiak, I., Glogowski J., Goryczko K., Dobosz S., Kuzminski H., Strzezek J., Demianowicz W., 2001. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology*, 56, pp.177-192.
- Babiak I., Dobosz S., Goryczko K., Kuzminski H., Brzuzan P., Ciesielski S., 2002 a. Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factors. *Theriogenology*, 57, pp.1229 – 1249.
- Babiak I., Glogowski J., Dobosz S., Kuzminski H., Goryczko K., 2002 b. Semen from rainbow trout produced using cryopreserved spermatozoa is more suitable for cryopreservation. *Journal of Fish Biology*, 60, pp.561–570.
- Barbato F., Canese S., Moretti F., Misiti S., Laconi F., Rana K., 2005. Preliminary experiences for cryopreservation of *Sparus aurata* and *Diplodus puntazzo* semen. FAO, Rome, Italy.
- Barboudi A., Doulias P.T., Zhu B.Z., Frei B., Galaris D., 2001. Intracellular Iron, But not Copper, Plays a Critical Role in Hydrogen Peroxide-Induced DNA Damage. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(4), pp. 491-498.
- Barboudi A., Doulias P.T., Nousis L., Tenopoulou M., Galaris D., 2002. DNA Damage and Apoptosis in Hydrogen Peroxide-Exposed Jurkat Cells: Bolus Addition Versus Continuous Generation of H₂O₂. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(5), pp. 691-702.
- Bart, A.N., 2000. New Approaches in Cryopreservation of Fish Embryos. In : Cryopreservation in Aquatic Species. (ed. by Tiersch T.R. & Mazik P. M). *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, Louisiana, pp. 179–187.
- Baynes S.M., Scott A.P., Dawson A.P., 1981. Rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, spermatozoa: effect of cations and pH on motility. *Journal of Fish Biology*, 19, pp. 259–267.

- Baynes S.M., Scott A.P., 1987. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. *Aquaculture*, 66 (1), pp. 53–67.
- Bekkevold D., Hansen M.M., Loeschcke V., 2002. Male reproductive competition in spawning aggregations of cod (*Gadus morhua*, L.). *Molecular Ecology*, 11, pp.91– 102.
- Bennetau-Pelissero C., Breton B., Bennetau B., Corraze G., Le Menn F., Davail-Cuisset B., Helou C., Kaushik S.J., 2001. Effect of genistein-enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 121, pp.173– 187.
- Billard R. , Cosson M.P., 1992. Some Problems Related to the Assessment of Sperm Motility in Freshwater Fish. *The journal of experimental zoology*, 261, pp.122–131.
- Billard R., Cosson I., Crim I.W., Sucuet M., 1995. Sperm Physiology and Quality. In : Broodstock management and egg and larval quality. (ed. by Bromage N.R. & Roberts R.J.), pp. 26–75, Cambridge University Press, Cambridge.
- Billard R., Cosson J., Linhart O., 2000. Changes in the flagellum morphology of intact and frozen/thawed Siberian sturgeon *Acipenser baerii* (Brandt) sperm during motility. *Aquaculture Research*, pp.283 – 287.
- Billard R., Cosson J., Noveiri S.B., Pourkazemi M., 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*, 236, pp. 1 –9.
- Bromage N., 1995. Broodstock Management and Seed Quality – General Considerations. In : Broodstock management and egg and larval quality (ed. by Bromage N.R. & Roberts R.J.), pp. 2–25, Cambridge University Press, Cambridge.
- Cabrita E., Robles V., Rebordinos L., Sarasquete C., Herraez M.P., 2005. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 50, pp.144–153.

- Caffey R.H., Tiersch T.R., 2000. Cost Analysis for Integrating Cryopreservation into an Existing Fish Hatchery. *Journal of the World Aquaculture Society*: 31(1), pp. 51–58.
- Carrell D. T., 2000. Semen Analysis at the Turn of the Century: An Evaluation of Potential Uses of New Sperm Function Assays, Systems Biology in *Reproductive Medicine*, 44:1, pp. 65 – 75.
- Carolsfeld J., Harvey B.J., 1993. Induced breeding in tropical fish culture. IDRC Press. Ottawa, Canada. ISBN 0-88936-633-0, pp. 120-125.
- Casselman S. J., Montgomerie R., 2004. Sperm traits in relation to male quality in colonial spawning bluegill. *Journal of Fish Biology*, 64, pp.1700–1711.
- Castranova D.A., King V W., Woods L.C., 2005. The effects of stress on androgen production, spermiation response and sperm quality in high and low cortisol responsive domesticated male striped bass. *Aquaculture*, 246, pp.413– 422.
- Chao N.H., Lin T.T., Chen Y.J., Hsu H.W., Liao I.C., 1997. Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam. *Aquaculture*, 155, pp. 31–44.
- Chen S.L., Ji X.S., Yo G.C., Tian Y.S., Sha Z.X., 2004. Cryopreservation of sperm of turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. *Aquaculture*, 236(1-4), pp. 547–556.
- Chereguini O., Cal R.M., Dreanno C., Ogier de Baulny B., Suquet M., Maisse G., 1997. Short-term storage and cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) sperm. *Aquatic Living Resources.*, 10, pp.251–255.
- Chereguini O., Garcia de la Banda I., Herrera M., Martinez C., De la Hera M., 2003. Cryopreservation of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) sperm: fertilization and hatching rates. *Aquaculture Research*, 34, pp.739–747.
- Chowdhury I., Joy K.P., 2001. Seminal vesicle and testis secretions in *Heteropneustes fossilis* (Bloch): composition and effects on sperm motility and fertilization. *Aquaculture*, 193(3), pp. 355–371.

- Christ S.A., Toth G.P., McCarthy H.W., Torsella J.A., Smith M.K., 1996. Monthly variation in sperm motility in common carp assessed using computer-assisted sperm analysis (CASA). *Journal of Fish Biology*, 48, pp.1210–1222.
- Christensen J.M., Tiersch R.T., 1996. Refrigerated Storage of Channel Catfish Sperm. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27(3), pp. 340–346.
- Ciereszko A., Dabrowski K., 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture*, 109 (3-4), pp.367–373.
- Ciereszko A., Dabrowski K., 1994. Relationship between biochemical constituents of fish semen and fertility: the effect of short-term storage. *Fish Physiology and Biochemistry*. 12, pp.357–367.
- Ciereszko A., Dabrowski K., 1995. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. *Biology of Reproduction*, 52, pp.982–988.
- Dabrowski, K., Ciereszko, A., 1996. Ascorbic acid protects against male infertility in teleost fish. *Experientia*, 52, pp.97– 100.
- DeGraaf J.D., King V W., Benton C., Berlinsky D.L., 2004. Production and storage of sperm from the black sea bass *Centropristis striata* L. *Aquaculture Research*, 35, pp.1457–1465.
- Detweiler C., Thomas P., 1998. Role of ions and ion channels in the regulation of Atlantic croaker sperm motility. *The Journal of Experimental Zoology*, 281(2), pp. 139 – 148.
- De Quatrefages, A., 1853. Vitalite des spermatozoides de quelques poissons d'eau douce. *Ann. Sci. Nat.* 19, pp.341-369.
- Dietrich G. J., Kowalski R., Wojtczak M., Dobosz S., Goryczko K., Ciereszko A., 2005. Motility Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Spermatozoa in Relation to Sequential Collection of Milt, Time of *Post-mortem* Storage and Anesthesia. *Fish Physiology and Biochemistry*, 31(1), pp. 1–9.

- Doulias P.T., Barbouti A., Galaris D., Ischiropoulos H., 2001. SIN-1-Induced DNA Damage in Isolated Human Perippheral Blood Lymphocytes as Assessed by Single Cell Gel Electrophoresis (Commet Assay). *Free Radical Biology & Medicine*, 30(6), pp. 670-685.
- Dreanno C., Sequet M., Quemener L., Cosson J., Fierville F., Normant Y., Billard R., 1997. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa, *Theriogenology*, 48, pp. 589–603
- Drokin I.S., 1993. Phospholipid distribution and fatty acid composition ophosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in sperm of some freshwater and marine species of fish. *Aquatic Living Resources*, 6, pp.49-56.
- Dulioust E., Toyama K., Busnel M.C., Moutier R., Carlier M., Marchaland C., Ducot B., Roubertoux P., Auroux M., 1995. Long-term effects of embryo freezing in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(2), pp.589–593.
- Evenson D.P., Jost L.K., Marshall D., Zinaman M.J., Clegg E., Purvis K., de Angelis P., Claussen O.P., 1999. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*, 14, pp.1039 -1049.
- Fauvel C., Suquet M., Dreanno C., Zonno V., Menu B., 1998. Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions. *Aquatic Living Resources*, 11 , pp. 387–394.
- Feigin, P., 1997. Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks—strategies in research and application. *Aquaculture*, 155, pp.13–30.
- Fernández J.L., Goyanes V.J., Ramiro-Díaz J., Gosálvez J., 1998. Application of fish for in situ detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 82, pp.251 -256.
- Fernández J.L., Muriel L., Rivero M.T., Goyanes V., Vazquez R., Alvarez J.G., 2003. The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *Journal of Andrology*, 24(1).

- Fitzsimmons C., McLaughlin E.A., Mahony M.J., Clulow J., 2007. Optimisation of Handling, Activation and Assessment Procedures for *Bufo marinus* spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development*, 19(4), pp. 594 - 601
- Flajshans M., Cosson J., Rodina M., Linhart O., 2004. The application of image cytometry to viability assessment in dual fluorescence-stained fish spermatozoa. *Cell Biology International*, 28, pp.955–959.
- Franks, F., 1985. Biophysics and Biochemistry at Low Temperatures. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 210 pp.
- Franks F., 1986. Biophysics and Biochemistry at Low Temperatures. Author(s) of Review: D. E. Pegg. *New Phytologist*, 104(2), pp. 311-312.
- Frehney R., 1987. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, pp. 117. Alan R. Liss. Inc., New York.
- Gage M.J.G., Mac Farlane C., Yeates S., Shackleton R., Parker G.A., 2002. Relationships between sperm morphometry and sperm motility in the Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, 61, pp.1528– 1539.
- Geffen A.J., Evans J.P., 2000. Sperm traits and fertilisation success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 182, pp.61–72.
- Glogowski J., Kwasnik M., Piros B., Dabrowski K., Goryczko K., Dobosz S., Kuzminski H., Ciereszko A., 2000. Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success. *Aquaculture Research*, 31(3), pp.289–296.
- Gronczewska J., Zietara M.S., Biegniowska A., Skorkowski E.F., 2003. Enzyme activities in fish spermatozoa with focus on lactate dehydrogenase isoenzymes from herring (*Clupea harengus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 134, pp.399– 406.
- Grzyb K., Rychlowski M., Biegniowska A., Skorkowski E.F., 2003. Quantitative determination of creatine kinase release from herring (*Clupea harengus*) spermatozoa induced by tributyltin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 134, pp.207– 213.
- Guest W.C., Avault J.W., Roussel J.D., 1976. Preservation of Channel Catfish Sperm. *Transactions of the American Fisheries Society*, 105, pp. 469– 474.

- Gwo J.C., 1993. Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. *Theriogenology*, 39, pp.1331-1342.
- Gwo J.C., Strawn K., Longnecker M.T., Arnold C.R., 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture* 94, pp.355-375.
- Gwo J.C., Arnold C.R., 1992. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa: evaluation of morphological changes. *The Journal of Experimental Zoology*, 264, pp.444-453.
- Gwo J.C., 1993. Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. *Theriogenology*, 39(6), pp. 1331-1342.
- Harvey B., 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. *Aquaculture*, 32, pp. 313-320.
- Henneguy L.F., 1877. Recherches sur la vitalite des spermatozoides de la truite. CR. Acad. Sci., 84, pp.1333-1335.
- Ho Kang K., Hee Kho K., Chen Z.T., Kim J.M., Kim Y.H., Zhang Z. F., 2004. Cryopreservation of filefish (*Thamnaconus septentrionalis*, Gunther, 1877) sperm. *Aquaculture Research*, 35, pp.1429-1433.
- Horvath A., Urbanyi B., 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish. *Aquaculture Research*, 31, 317- 324.
- Horvath, A., Miskolczi, E., Urbanyi, B., 2003. Cryopreservation of common carp sperm. *Aquat. Living Resour.* 16, 457-460.
- Hughes C.M., Lewis S.E., McKelvey-Martin V.J., Thompson W., 1996. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men using a modified comet assay. *Molecular Human Reproduction*, 2, pp.613 -619.
- Izquierdo M.S., Fernandez-Palacios H., Tacon A.G.J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197, pp. 25- 42.
- Ji X.S., Chen S.L., Tian Y.S., Yu G.C., Sha Z.X., Xu M.Y., S.C. Zhang, 2004. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization. *Aquaculture*, 241(1-4), pp. 517-528.
- Kerby H.J., 1983. Cryogenic Preservation of Sperm from Striped Bass. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112(1), pp. 86-94.

- Kime D.E., Van Look K.J.W., McAllister B.G., Huyskens G., Rurangwa E. , Ollevier F., 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C, 130, pp. 425-433.
- Kime, D.E., Tveiten, H., 2002. Unusual motility characteristics of sperm of the spotted wolffish. *Journal of fish biology*, 61, pp.1549–1559.
- Kopeika E. F, Williot P., Goncharov B.F., 2000. Cryopreservation of Atlantic sturgeon (*Acipenser sturio* L., 1758) sperm: First results and associated problems. *Boletín. Instituto Español de Oceanografía*, 16 (1-4), pp.167–173.
- Kopeika J., Kopeika E., Zhang T., Rawson D., Holt W., 2004. Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm. *Theriogenology*, 61(9), pp.1661-1673.
- Koteeswaran R., Pandian T. J., 2002. . Live sperm from post-mortem preserved Indian catfish. Centre for Advanced Studies in Functional Genomics, Madurai. Kamaraj University, Madurai, India.
- Kubokawa, K., Watanabe T., Yoshioka M., Iwata M., 1999. Effects of acute stress on plasma cortisol, sex steroid hormone and glucose levels in male and female sockeye salmon during the breeding season. *Aquaculture*, 172, pp.335–349.
- Kurocura H., Hirano R., Tomita M. and Wahashi M.I., 1984. Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture*, 37, pp.267–273.
- Labbe C., Maisse G., 1996. Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm cryopreservation: relation to change in the lipid composition of the plasma membrane. *Aquaculture*, 145(1), pp. 281–294.
- Labbe C., Martoriati A., Devaux A., Maisse G., 2001. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development.*, 60(3), pp. 397 – 404.

- Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T., Patzner R.A., 1996. Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. *Fish Physiology and Biochemistry*, 15(2), pp 167–179.
- Lahnsteiner F., Weismann T., Patzner R.A., 1998. An efficient method for cryopreservation of testicular sperm from the Northern pike, *Esox lucius* L.. *Aquaculture Research*, 29(5), pp. 341–347.
- Lahnsteiner F., 2000. Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike. *Aquaculture Research*, 31(3), pp.245–258.
- Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T., 2003. Effects of media, fertilization technique, extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. *Theriogenology*, 60, pp.829–841.
- Lahnsteiner F., Mansour N., Berger B., 2004. The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*, 65, pp.1283–1297.
- Lang P.R., Riley K.L, Chandler J.E., Tiersch T.R., 2003. The Use of Dairy Protocols for Sperm Cryopreservation of Blue Catfish *Ictalurus furcatus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 34(1), pp. 66–75.
- Larson K.L., DeJonge C., Barnes A., Jost L., Evenson D.P., 2000. Relationship between assisted reproductive techniques (ART) outcome and status of chromatin integrity as measured by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Human Reproduction*, 15, pp. 1717 -1722.
- Leung L.K.P., 1987. Cryopreservation of spermatozoa of the barramundi, *Lates calcarifer* (Teleostei : Centropomidae). *Aquaculture*, 64, pp.243-247.
- Li J., Liu Q., Zhang S., 2006. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 24(4), pp. 370–377.
- Linhardt O., Billard R., 1994. Spermiation and sperm quality of European catfish (*Silurus glanis*) after implantation of GNRH analogs and injection of carp pituitary extract. *Journal of Applied Ichthyology*, 10, pp.182– 188.

- Liu Q., Li J., Zhang S., Ding F., Xu X., Xiao Z., Xu S., 2006. An Efficient Methodology for Cryopreservation of Spermatozoa of Red Seabream, *Pagrus major*, with 2-mL Cryovials. *Journal of the World Aquaculture Society*, 37(3), pp. 289–297.
- Liu Q.H., Li J., Xiao Z.Z., Ding F.H., Yu D.D., Xu X.Z., 2007. Use of computer-assisted sperm analysis (CASA) to evaluate the quality of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major*). *Aquaculture*, 263(1-4), pp. 20–25.
- Lubzens E., Daube N., Pekarsky I., Magnus Y., Cohen A., Yusefovich F., Feigin, P., 1997. Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks—strategies in research and application. *Aquaculture*. 155, 13– 30.
- Maisse G., Pinson A., Loir M., 1988. Caractérisation de l'aptitude à la congélation du sperme de truite arc en ciel (*Salmo gairdneri*) par des critères physico-chimiques. *Aquatic Living Ressources*, 1, pp. 45-51.
- Manicardi G.C., Bianchi P.G., Pantano S., Azzoni P., Bizzaro D., Bianchi U., Sakkas D., 1995. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod.*, 52, pp.864–867.
- Maria A.N., Viveiros A.T.M., Orfao L.H., Oliveira A.V., Moraes G.F., 2006. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). *Animal Reproduction*, 3(1), pp.55–60.
- Marques S., Godinho P.H., 2004. Short-term Cold Storage of Sperm from Six Neotropical Characiformes Fishes. *Brazilian archives of biology and technology.*, 47(5), pp. 799–804.
- Melo F.C.S.A., Godinho H.P., 2006. A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaeni*. *Animal Reproduction*, 3(3), pp.380–385.
- Mims S., Lazur A., Shelton W., Gomelsky B., Chapman F., 2002. Species Profile: Production of sturgeon. *Southern Regional Aquaculture Center Publication*, No 7200.
- Moczarski M., Koldras M., 1982. Properties of tench – *Tinca tinca* L. sperm and experiments with freezing it at -196° C. *ACTA ichthyologica et piscatorial*. Vol. XII, Fasc. 2.

- Morisawa M., Suzuki K., Morisawa S., 1983. Effects of potassium and osmolality on Spermatozoan motility of salmonid fishes. *Journal of Experimental Biology*, 107, pp.05–113.
- Noga E.J., Kerby J.H., King W., Aucoin D.P., Giesbrecht F., 1994. Quantitative comparison of the stress response of striped bass (*Morone saxatilis*) and hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops* and *Morone saxatilis* x *Morone americana*). *American Journal of Veterinary Research*, 55(3), pp.405–9.
- Nunez-Martinez I., Moran J.M., Pena F.J., 2005. Do Computer-Assisted, Morphometric-Derived Sperm Characteristics Reflect DNA Status in Canine Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 40, pp.537–543.
- O' Connel M., Mc Clure N., Lewis S.E.M., 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, 17(3), pp.704 – 709.
- Ogier de Baulny B., Le Vern Y, Kerboeuf D., Maisse G., 1997. Flow Cytometric Evaluation of Mitochondrial Activity and Membrane Integrity in Fresh and Cryopreserved Rainbow Trout(*Oncorhynchus mykiss*) Spermatozoa. *Cryobiology*, 34, pp.141–149.
- Ostling O., Johanson K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemichal and Biophysical Research Communication*, 123, pp.291-298.
- Otémé Z.J., 1998. Sensitivity to inbreeding and sperm cryopreservation in the catfish. *Heterobranchus longifilis*, Valenciennes, 1840. In: Genetics and aquaculture in Africa (ed by Agnese Jean-Francois). Paris: Orstom, pp. 257–268 (Colloques et Seminaires). Genetique et Aquaculture en Afrique.
- Oteme Z.J., Nunez Rodriguez J., Kouassi C.K., Hem S., Agnese J-F., 1996. Testicular structure, spermatogenesis and sperm cryopreservation in the African clariid catfish *Heterobranchus longifilis* (Valenciennes, 1840). *Aquaculture Research*, 27, pp.505–513.

- Papaioannou K.Z., Murphy R.P., Monks R.S., Hynes N., Ryan M.P., Boland M.P., Roche J.F., 1997. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. *Theriogenology*, 48(2), pp.299–312.
- Parks J.E., Graham J.K., 1992. Effects of Cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38, pp. 209–222.
- Parker G.A., 1990. Sperm competition games: raffles and roles. *Proceedings: Biological Sciences. London Ser. B*, 242, pp.120-126.
- Pavlov D. A., 2006. A method for the assessment of sperm quality in fish. *Journal of Ichthyology*, 46(5), pp. 391-398.
- Perchec G., Paxion C., Cosson J., Jeulin C., Fierville F., Billard R., 1998. Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. *Aquaculture*, 160, pp.317–328.
- Pillai M.C., Yanagimachi R., Cherr G.N., 1994. *In vivo* and *in vitro* initiation of sperm motility using fresh and cryopreserved gametes from Pacific herring, *Clupea pallasii*. *Journal of Experimental Zoology*, 269, 62-68.
- Powell J., 2003. Cryopreservation of milt. How it's done and is it worth it? *Northern Aquaculture*.
- Rakitin A., Ferguson M.M., Trippel E.A., 1999. Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic cod (*Gadus morhua*): correlation and variation during the spawning season. *Aquaculture*, 170, pp.349– 358.
- Rana K. 1995. Preservation of gametes. In : Broodstock management and egg and larval quality (ed. by Bromage N.R. & Roberts R.J.), pp. 53-76, Cambridge University Press, Cambridge.
- Rawson D.M., Zhang T., 2005. New approaches to the cryopreservation of fish oocytes and embryos. The role of biotechnology. Luton institute of research in the applied natural sciences, university of luton, uk.
- Richardson G.F., Crim L.W., Yao Z., Short C., 1995. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen. In: *Proceedings of the Fifth International Symposium, Reproductive Physiology of Fish* (ed. by F.W. Goetz & P. Thomas), pp.136.
- Richardson G.F., Wilson C.E., Crim L.W., Yao Z., 1999. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen in large straws. *Aquaculture*, 174, pp. 89–94.

- Richardson G F., Miller T L., McNiven M A., 2000. Cryopreservation of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), semen in various extenders and in three sizes of straw. *Aquaculture Research*, 31 (3), pp. 307-315.
- Rideout R. M., Litvak M. K., Trippel E. A., 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. *Aquaculture Research*, 34, pp. 653–659.
- Rideout R. M., Trippel E.A., Litvak M.K., 2004. The development of haddock and Atlantic cod sperm cryopreservation techniques and the effect of sperm age on cryopreservation success. *Journal of Fish Biology*, 65, pp.299–311.
- Robles V., Cabrita E., Cuñado S., Herráez M.P, 2003. Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. *Aquaculture*, 224, pp. 203–212.
- Rodina M., Gela D., Kocour M., Alavi S., Hulak M., Linhart O., 2007. Cryopreservation of tench, *Tinca tinca*, sperm: Sperm motility and hatching success of embryos. *Theriogenology*, 67(5), pp. 931-940.
- Rodriguez S.J.S., Prieto S.I.P., Minondo M.P.V., 1993. Flow cytometric analyses of infectious pancreatic necrosis virus attachment to fish sperm. *Diseases of Aquatic Organisms*, 15, pp.153– 156.
- Routray, P., Suzuki, T., Kimizuka, N., Kawai, K., Strussman, C.A., Takai, R., 2001. Cold tolerance and ice nucleation temperature of medaka (*Oryzias latipes*) embryos with different cryoprotectant treatments. *Cryobiology and Cryotechnology*, 47 (2), pp. 1–6.
- Routray P., Choudhary A.K., Dash S.N., Verma D.K., Dash C., Swain P., Jena J.K., Gupta S.D., Sarangi N., 2006. Cryopreservation of dead fish spermatozoa several hours after death of Indian major carp, *Labeo rohita* and its successful utilization in fish production. www.Sciencedirect.com.

- Rurangwa E., Volckaert F.A.M., Huyskens G., Kime D.E., Ollevier F., 2001. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilisation in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*, 55, pp.751– 769.
- Rurangwa E., Biegniewska A., Slominska E., Skorkowski E.F., Ollevier F., 2002. Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131, pp.335– 344.
- Rurangwa E., Kime D.E., Ollevier F., Nash J.P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234, pp.1 –28.
- Sansone G., Fabbrocini A., Leropoli S., Langellotti A., Occidente M., Matassino D., 2002. Effects of extender composition, cooling rate and freezing on the motility of sea bass spermatozoa after thawing. *Cryobiology* 44, pp. 229–239.
- Sasado T., Kota Y., Furutani-Seiki M., Kondoh H., 2001. Cryo-preservation of Medaka sperm. <http://shigen.lab.nig.ac.jp/medaka/medakabook/index.php>.
- Scott A.P., Baynes S.M., 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology*, 17, pp.707–739.
- Segovia M., Jenkins J.A., Paniagua-Chavez C., Tiersch T.R., 2000. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Theriogenology*, 53, pp.1489–1499.
- Silva P.F.N., Gadella B.M., 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65, pp. 958–978.
- Singh N.P., McCorry M.Y., Tice R.R., Schneider E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, pp. 184-191.

- Sunarma A., Hastuti D.W.B., Sistina Y., 2007. Utilization of honey as an Extender Combined to Different Cryoprotectant on Sperm Cryopreservation of Nilem (Indonesian Sharkminnow, *Osteochilus hasseltii* Valenciennes, 1842). Indoorcommunity. Files. Wordpress.com.
- Suquet M., Dreanno C., Dorange G., Normant Y., Quemener L., Gaignon J.L., Billard R., 1998. The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilisation, and storage capacities. *Journal of Fish Biology*, 52, pp.31– 41.
- Suquet M., Dreanno C., Fauvel C., Cosson J., Billard R., 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 31(3), pp.231 – 243.
- Taborsky M., 1998. Sperm competition in fish: 'bourgeois' males and parasitic spawning. *Trends in Ecology and Evolution*, 13, pp.222-227.
- Tate A.E., Helfrich L.A., 1998. Off-season spawning of sunshine bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) exposed to 6- or 9-month phase-shifted photothermal cycles. *Aquaculture*, 167(1), pp. 67-83.
- Tiersch T. R., 2001. Cryopreservation in Aquarium Fishes. *Marine Biotechnology*, 3, pp.212 –223.
- Toledo J.D., Kurokura H., 1990. Cryopreservation of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* embryos. *Aquaculture*, 91, pp. 385–394.
- Trippel A.E., 2003. Estimation of male reproductive success of Marine Fishes. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, iim.csic.es.
- Tvedt H.B., Benfey T.J., Martin-Robichaud D.J., Power J., 2001. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilisation success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture*, 194, pp.191–200.
- Van Look K.J., 2001. The development of sperm motility and morphology techniques for the assessment of the effects of heavy metals on fish reproduction. PhD thesis. University of Sheffield.
- Van Look K. J. W., Kime D. E., 2003. Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm. *Journal of Fish Biology*, 63, pp.1020–1033.

- Vermeirssen E.L.M., Scott A.P., Mylonas C.C., Zohar Y., 1998. Gonadotrophin-releasing hormone agonist stimulates milt fluidity and plasma concentrations of 7,20h-dihydroxylated and 5h-reduced, 3a-hydroxylated C21 steroids in male plaice (*Pleuronectes platessa*). *General and Comparative Endocrinology*, 112, pp.163–177.
- Williot P., Kopeika E.F., Goncharo B.F., 2000. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt). *Aquaculture*, 189, pp. 53–61.
- Williot P., Gulyas T., Ceapa C., 2002. An analogue of GnRH is effective for induction of ovulation and spermiation in farmed Siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brandt. *Aquaculture research*, 33, pp. 735–737.
- Winnicki A., Tomasik L., 1976. Spermatocrit as a method for biological evaluation of fish sperm. *Acta Ichthyologica Et Piscatoria*, 6, pp. 3-7.
- Withler F.C., Lim L.C., 1982. Preliminary observations of chilled and deep-frozen storage of grouper (*Epinephelus tauvina*) sperm. *Aquaculture*. 27, pp.389-392.
- Woolsey J., Holcomb M., Cloud J.G., Ingermann R.L., 2006. Sperm motility in the steelhead *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): influence of the composition of the incubation and activation media. *Aquaculture Research*, 37, pp.215–223.
- [www. Cryobiosystem-imv.com](http://www.Cryobiosystem-imv.com)
- [www. Wikipedia.org](http://www.Wikipedia.org)
- Yao Z., Crim L.W., Richardson G.F., Emerson C.J., 1995. Cryopreservation, motility and ultrastructure of sperm from the ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.), an internally fertilizing marine teleost. In : Proceedings of the fifth International Symposium, Reproductive Physiology of Fish (ed. by F.W. Goetz & P. Thomas), pp. 149, Austin.
- Yao Z., Crim L.W., Richardson G.F., Emerson C.J., 2000. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation, *Aquaculture*, 181, pp. 361–375.
- Zhang Y.Z., Zhang S.C., Liu X.Z., Xu Y.Y., Wang C.L., Sawant M.S., Li J., Chen S.L., 2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. *Theriogenology*, 60, pp. 989–996.

- Zheng W., Stacey N.E., 1996. Two Mechanisms for Increasing Milt Volume in Male Goldfish, *Carassius auratus*. *The journal of experimental zoology*, 276, pp.287-295.
- Zilli L., Schiavone R., Zonno V., Storelli C., Vilella S., 2003. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology*, 47(3), pp.227-35.
- Zilli L., Schiavone R., Zonno V., Storelli C., Vilella S., 2004. Adenosine Triphosphate Concentration and b-D-Glucuronidase Activity as Indicators of Sea Bass Semen Quality. *Biology of reproduction*, 70, pp.1679-1684.
- Zilli L., Schiavone R., Zonno V., Rossano R., Storelli C., Vilella S., 2005. Effect of Cryopreservation on Sea Bass Sperm Proteins. *Biology of reproduction*, 72, pp.1262–1267.
- Zrimsek P., Kunc J., Kosec M., Mrkun J., 2004. Spectrophotometric application of resazurin reduction assay to evaluate boar semen quality. *International journal of andrology*, 27, pp.57–62.
- Πάσχος Ι. 2004. Ιχθυοκαλλιέργειες Εσωτερικών Υδάτων, Ιωάννινα 2002, σελ.209 –212.
- Χατζάκη Ε., 2002. Μέθοδος Μέτρησης του Ρυθμού πολλαπλασιασμού του Κυτταρικού Τύπου PC12. Μεταπτυχιακή εργασία, Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Νευροεπιστημών, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης.



ΛΗΞΗ	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΔΑΝΕΙΖΟΜΕΝΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Τηλ.: 74760-61

2441066080

